

Assoziationen zwischen Mutationen ausgewählter  
ribosomaler Bestandteile von *Brachyspira hyodysenteriae*  
und MHK-Werten für Pleuromutiline, Makrolide  
und Lincosamide

---

**SONJA HILLEN**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

**[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)**

Aus der Klinik für Wiederkäuer und Schweine  
Professur für Schweinekrankheiten  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner  
und dem  
Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. em. Dr. Dr. habil. G. Baljer

**Assoziationen zwischen Mutationen ausgewählter ribosomaler  
Bestandteile von *Brachyspira hyodysenteriae* und MHK-Werten  
für Pleuromutiline, Makrolide und Lincosamide**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

gingereicht von

**Sonja Hillen**

Tierärztin aus Essen in Oldenburg

Gießen, 2012

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Reiner

Prof. em. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Tag der Disputation: 12.12.2012

***Meiner Familie***

Teile der Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Proceedings:

4<sup>th</sup> European Symposium of Porcine Health Management, 25. – 27. 04. 2012

**Associations between mutations in L3 and 23S rRNA and minimum inhibitory concentrations of Pleuromutilins in 64 German field isolates of *B. hyodysenteriae***

S. Hillen, H. Willems, W. Herbst, J. Rohde und G. Reiner

Gemeinschaftsveranstaltung von ATF und Landestierärztekammer Rheinland – Pfalz:

Schweinekrankheiten am 01./02. September in Koblenz, 01. – 02. 09. 2012

**Brachyspiren: Verbreitung, Diagnostik, Resistenzen**

Sonja Hillen, Gerald Reiner

**Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis .....	VI
Abkürzungsverzeichnis .....	VII
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht.....	2
2.1 Brachyspiren .....	2
2.2 <i>B. hyodysenteriae</i> .....	3
2.2.1 Charakteristika.....	3
2.2.2 Genetische Eigenschaften.....	4
2.2.3 Verbreitung.....	4
2.2.4 Infektionsquellen .....	5
2.2.5 Pathogenese der Dysenterie.....	6
2.2.6 Kultur und Identifikation.....	8
2.2.7 Nukleinsäurebasierte Nachweisverfahren .....	10
2.2.8 Therapie und Bekämpfung der Dysenterie.....	11
2.3 Resistenzen .....	18
2.3.1 Allgemein .....	18
2.3.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK).....	19
2.3.3 Resistenzmechanismen.....	21
2.3.4 Verbreitung von Resistenzen gegen <i>B. hyodysenteriae</i> .....	29
2.3.5 Methoden zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit.....	31
3 Material und Methoden .....	35
3.1 Material.....	35
3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer.....	35
3.1.2 Bakterienstämme .....	35
3.2 Methoden .....	37
3.2.1 Anzucht und Kultivierung der Brachyspiren.....	37
3.2.2 Mikrobouillondilutionstest (MBDT) .....	38
3.2.3 Einordnung der Befunde.....	40
3.2.4 Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte mittels PCR .....	41
3.2.5 Gelelektrophorese.....	43

---

3.2.6	DNA-Sequenzierung und Auswertung der Nukleinsäuresequenzen.....	43
3.2.7	Statistische Auswertung .....	45
4	Ergebnisse.....	46
4.1	MHK-Werte von <i>B. hyodysenteriae</i> .....	46
4.2	Mutationen in der 23S rRNA.....	54
4.3	Mutationen im ribosomalen Protein L3 .....	55
4.4	Einfluss kombinierter Genvarianten .....	57
4.5	Einfluss einer Therapie mit Tiamulin auf die MHK-Entwicklung von Bakterienpopulationen im Feld .....	62
4.6	Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4, L2 und L22.....	65
5	Diskussion .....	66
6	Zusammenfassung .....	73
7	Summary.....	75
8	Literaturverzeichnis .....	77
9	Anhang .....	89



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Strukturformel des Makrolid- Antibiotikums Tylosin (16-gliedriger Laktone-Ring, 3 Zucker).....	13
<b>Abbildung 2:</b> Strukturformel des Lincosamid- Antibiotikums Lincomycin: ein Propylprolin mit dem Aminozucker Methylthiolincosaminid (oberer Bildteil).....	15
<b>Abbildung 3:</b> Die Strukturformeln der Pleuromutilinderivate Tiamulin (-fumarat) (linke Bildhälfte) und Valnemulin (Trizyklischer Mutilinkern mit aliphatischer Seitenkette) (rechte Bildhälfte).....	16
<b>Abbildung 4:</b> Tiamulin bindet im Peptidyltransferasezentrum, am Eingang des ribosomalen Tunnels. Dabei ist der Mutilin-Kern fest in der A-tRNA Bindungstasche an folgende Nukleotide gebunden : G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 (E. coli- Nummerierung). Die Extension reicht bis auf die andere Seite des Tunnels, wo sie mit der P-tRNA Bindungsstelle überlappt (nach Schlünzen et al., 2004). ....	17
<b>Abbildung 5:</b> Überlappung von Tiamulin mit den A- und P-tRNA-Enden (Schlünzen et al., 2004).....	18
<b>Abbildung 6:</b> Modell der Sekundärstruktur der Domäne V der 23S rRNA (Hidalgo et al., 2011). Die Pfeile stellen die Punktmutationen, die Buchstaben die daraus induzierten Resistenzen gegen die verschiedenen Antibiotika dar (M: Makrolid, L: Lincosamid, P: Pleuromutilin).....	26
<b>Abbildung 7:</b> Vergleich der mittleren Minimalen Hemmkonzentrationen für Tiamulin im Agar- bzw. Bouillondilutionsverfahren; <i>Brachyspira hyodysenteriae</i> (n=221) (Kessler, 2001). ....	34
<b>Abbildung 8:</b> Testansatz des MBDT (Reihe 1: Gebrauchslösung der Antibiotika, Reihe 2-11: log2 Verdünnungsstufen, Reihe 12: Wachstumskontrolle) (nach Schlez, 2011). ....	40
<b>Abbildung 9:</b> Verteilung der Isolate nach MHK (Tylosin) (n=39); Grenzwerte zur Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) (Rønne und Szancer [1990]) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl findet sich über den Balken. ....	46
<b>Abbildung 10:</b> Verteilung der Isolate nach MHK (Lincomycin) (n=39), Grenzwerte zur Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) (Rønne und Szancer [1990]) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl findet sich über den Balken. ....	47

<b>Abbildung 11:</b> Verteilung der Isolate nach MHK (Tiamulin) (n=64), Grenzwerte zur Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) (Rønne und Szancer [1990]) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl findet sich über den Balken. ....	48
<b>Abbildung 12:</b> Verteilung der Isolate nach MHK (Valnemulin) (n=59). Die Grenzwerte der Fa. Novartis zur Einteilung in sensibel (S) und intermediär (I) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl befindet sich über den Balken.....	49
<b>Abbildung 13:</b> Box Plots mit Whisker: Darstellung der MHK-Verteilung für die untersuchten Antibiotika. Die Mediane werden als Querstrich und Zahlenwert in den Abbildungen angegeben (n= 39 [Tylosin; Lincomycin]; n= 59 [Valnemulin]; n= 64 [Tiamulin]). ....	50
<b>Abbildung 14:</b> Box Plots mit Whisker: Darstellung der MHK- Verteilung für die untersuchten Antibiotika. Die jeweiligen Mediane werden als Querstrich und Zahlenwert in den Abbildungen angegeben (n= 39 [Tylosin; Lincomycin]; n= 59 [Valnemulin]; ....	50
<b>Abbildung 15:</b> Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=39]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Tylosin).....	51
<b>Abbildung 16:</b> Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=39]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Lincomycin). ....	52
<b>Abbildung 17:</b> Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=59]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Valnemulin).	53
<b>Abbildung 18:</b> Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=64]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Tiamulin). ...	53
<b>Abbildung 19:</b> Gensequenz des ribosomalen Proteins L3 von <i>B. hyodysenteriae</i> (NC_012225.1).....	55
<b>Abbildung 20:</b> Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L3 von <i>B. hyodysenteriae</i> (NC_012225.1).....	55
<b>Abbildung 21:</b> Einfluss des SNPs an Position 443 im Gen des ribosomalen Proteins L3 auf die MHK-Werte (Tiamulin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n=64). ....	56
<b>Abbildung 22:</b> Zusammenhang zwischen der Variante Serin im ribosomalen Protein L3 und den MHK-Werten von Tiamulin gegenüber <i>B. hyodysenteriae</i> -Isolaten zwischen 1998-2012. ....	57
<b>Abbildung 23:</b> Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK- Werte (Tiamulin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n= 34 [Asn/G2535]; n= 12 [Asn/G2535A]; n= 16 [Ser/G2535]). ....	58

<b>Abbildung 24:</b> Einfluss des SNPs 2535 der 23S rRNA auf die MHK-Werte (Tiamulin). Der Median ist als Querstrich mit Zahlenwert dargestellt (n= 51 [G2535]; n= 13 [G2535A]).	59
<b>Abbildung 25:</b> Einfluss des SNPs 2535 der 23S rRNA auf die MHK- Werte (Valnemulin). Der Median ist als Querstrich mit Zahl dargestellt (n= 47 [G2535] n= 12 [G2535A]).	59
<b>Abbildung 26:</b> Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK-Werte (Valnemulin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n= 30 [Asn/G2535]; n= 12 [Asn/G2535A]; n= 16 [Ser/G2535]).	60
<b>Abbildung 27:</b> Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK-Werte (Lincomycin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n= 19 [Asn/G2535]; n= 9 [Asn/G2535A]; n= 16 [Ser/G2535]).	61
<b>Abbildung 28:</b> Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK-Werte (Tylosin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n= 19 [Asn/G2535]; n= 9 [Asn/G2535A]; n= 16 [Ser/G2535]).	62
<b>Abbildung 29:</b> Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte (Tylosin). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Rønne und Szancer 1990).	63
<b>Abbildung 30:</b> Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte (Lincomycin). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Rønne und Szancer 1990).	63
<b>Abbildung 31:</b> Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte (Tiamulin) (n=8). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Rønne und Szancer 1990).	64
<b>Abbildung 32:</b> Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte (Valnemulin) (n=5). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Fa. Novartis).	64

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> MHK-Grenzwerte und Gewebekonzentrationen für verschiedene gegen Brachyspiren einsetzbare Antibiotika (zitiert nach Keßler, 2001) .....	21
<b>Tabelle 2:</b> Punktmutationen von Teilsequenzen der 23S rRNA (Domäne V) und dem Gen des ribosomalen L3 Proteins von <i>B. hyodysenteriae</i> und <i>B. pilosicoli</i> und die dazugehörigen MHK-Werte. Die Varianten stammen aus in vitro kultivierten und auf Tiamulin-Agar passagierten Stämmen und Feldisolaten (Pringle et al., 2004).....	24
<b>Tabelle 3:</b> MHK-Werte und Punktmutationen von Teilsequenzen der 23S rRNA (Domäne V) und dem Gen des ribosomalen L3 Proteins von <i>B. hyodysenteriae</i> spanischer Feldisolaten aus den Jahren 2008 bis 2009 (Hidalgo et al., 2011).....	25
<b>Tabelle 4:</b> <i>B. hyodysenteriae</i> -Isolate aus dem IHIT (Gießen) (n=40) .....	36
<b>Tabelle 5:</b> <i>B. hyodysenteriae</i> -Isolate aus dem Institut für Mikrobiologie, TiHo (Hannover) (n=24) .....	37
<b>Tabelle 6:</b> Stammlösungen, Gebrauchslösungen und Endkonzentrationen der Antibiotika im MBDT.....	38
<b>Tabelle 7:</b> Verwendete Primer .....	41
<b>Tabelle 8:</b> Pipettierprotokoll für die PCR (30 µl Ansatz).....	42
<b>Tabelle 9:</b> Thermocyclerprogramm .....	42
<b>Tabelle 10:</b> Darstellung der Häufigkeit des Vorkommens (in %) von Genvarianten an polymorphen Nukleotiden relativ zum Referenzstamm anhand der 64 untersuchten Stämme. ....	54
<b>Tabelle 11:</b> Darstellung der Häufigkeit des Vorkommens (in %) von Genvarianten an polymorphen Nukleotiden relativ zum Referenzstamm anhand der 64 untersuchten Stämme. ....	65

---

**Abkürzungsverzeichnis**

Å	Angström
ad	auffüllen auf
A. dest.	Aqua destillata
ADT	Agardilutionstest
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
B.	<i>Brachyspira</i>
BHI	brain-heart-infusion (Nährbouillon)
BHIF	brain-heart-infusion (Nährbouillon) mit 20% FKS
bp	Basenpaare
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CLSI (ehem.NCCLS)	The Clinical an Laboratory Standards Institute
ca.	Circa
cm.	Zentimeter
CVSSR	Colistin, Vancomycin, Spectinomycin, Spiramycin, Rifampicin
d	Tag
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonucleic acid
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fa.	Firma
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GuSCN	Guanidinthiocyanat
GTA	Gen Tranfer Agent
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> S	Schwefelwasserstoff

---

I	intermediär
IHIT	Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen
Ile	Isoleucin
kb	kilobasen
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
Kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
Kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
KWS-S	Klinik für Schweine, JLU Gießen
LOS	Lipooligosaccharide
LPS	Lipopolysaccharide
Lys	Lysin
M	Molar
MBDT	Mikrobouillondilutionstest
Mbp	Megabasenpaar
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MHK <sub>50</sub>	Minimale Hemmkonzentration, die 50 % der Bakterienisolate im Wachstum hemmt.
MHK <sub>90</sub>	Minimale Hemmkonzentration, die 90 % der Bakterienisolate im Wachstum hemmt.
min	Minute
ml	Milliliter
MLEE	Multilocus Enzyme Electrophoresis
MLSb	Makrolid-Lincosamid-Streptograminb
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamid-Dehydrogenase

---

n	Stichprobenumfang
OMP	Outer Membrane Protein
PCR	Polymerase-Chain-Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $\text{H}_3\text{O}^+$ -Ionenkonzentration
R	resistent
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid
RNA	Ribonucleic acid
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
S	sensibel
(23)S	Svedberg
SD	Schweinedysenterie
Sec	Sekunde
Ser	Serin
$\text{SiO}_2$	Siliciumoxid
SNP	Single Nucleotid Polymorphism
spp.	Spezies
s.u.	siehe unten
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TiHO	Tierärztliche Hochschule Hannover
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Tryptikase-Soja-Agar
U	Unit
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
V	Volt
VSH	Virus von <i>Serpulina hyodysenteriae</i>
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

# 1 Einleitung

Antibiotikaresistenzen stehen im Fokus des öffentlichen Interesses. Der Erforschung der molekularen Ursache von Resistenzmechanismen und der Entwicklung neuer Verfahren für die Resistenzdiagnostik kommt daher eine erhebliche Bedeutung zu. Probleme mit zunehmenden Resistenzen werden insbesondere bei *Brachyspira hyodysenteriae*, dem Erreger der Schweinedysenterie, einer weltweit vorkommenden Durchfallerkrankung bei Mastschweinen, beobachtet. Im Falle eines Krankheitsausbruchs sind im betroffenen Betrieb erhebliche ökonomische Einbußen durch reduzierte Futterverwertung und Tageszunahmen zu erwarten, zudem ist mit einer Zunahme der Totalverluste zu rechnen. Daher ist eine umgehende Behandlung der betroffenen Schweine meist unabdingbar. Allerdings wird in den letzten Jahren europaweit eine zunehmende Resistenzentwicklung bei *B. hyodysenteriae* gegen die gängigen Antibiotika zur Behandlung der Dysenterie beobachtet.

Während molekularbiologische Methoden zur raschen Diagnosestellung etabliert und weltweit verfügbar sind, ist die Prüfung der Resistenzlage der Stämme nach wie vor ein langwieriges Prozedere und nicht flächendeckend verfügbar.

Die Anzucht und Reinkultivierung der Brachyspiren ist aufwendig und nimmt Tage bis Wochen in Anspruch. Der Resistenztest führt zu weiterer Verzögerung. Die Anforderungen nach guter veterinärmedizinischer Praxis und des Tierschutzes können daher bei akuten Krankheitsausbrüchen durchaus in Konflikt geraten.

Um die Diskrepanz zu entschärfen, sind neue, schnellere Möglichkeiten zur Resistenztestung notwendig. Daher ist es sowohl von wissenschaftlichem als auch von praktischem Interesse, die Resistenzmechanismen von Brachyspiren gegenüber der effektivsten Antibiotikagruppe, den Pleuromutilinen, zu untersuchen. Die Resistenzentwicklung bei Pleuromutilinen scheint schrittweise zu erfolgen, unter Beteiligung eine Fülle von Punktmutationen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Assoziationen zwischen MHK-Werten und Genvarianten in, für die Bindung der Pleuromutiline verantwortlichen, ribosomalen Genen, an 64 *Brachyspira hyodysenteriae*-Isolaten aus Deutschland zu untersuchen.



## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Brachyspiren

Das Genus *Brachyspira* (*B.*) umfasst sieben Spezies, die Menschen, Tiere, darunter auch Vögel, kolonisieren (Hampson und La, 2006). Brachyspiren sind gram-negative Erreger, die eine hohe genetische Diversität zu anderen Spirochäten aufweisen. Sechs Spezies kolonisieren den Dickdarm von Schweinen, namentlich *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli*, *B. suanatina*, *B. murdochii*, *B. intermedia* und *B. innocens* (Hampson, 2012).

*B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* sind primär pathogene Durchfallerreger beim Schwein. In den frühen 1970er Jahren wurde *B. hyodysenteriae* als ursächlicher Erreger der Dysenterie identifiziert (Taylor und Alexander, 1971). Zunächst als *Treponema hyodysenteriae* bekannt, wurde dieses Bakterium der Gattung *Serpula*, dann *Serpulina* (Stanton, 1992) und schließlich aufgrund von Sequenzanalysen der 16S rRNA der Gattung *Brachyspira* (Ochiai et al., 1997) zugeordnet. Nach Neueintrag in naive Herden kommt es zu einem deutlichen klinischen Bild mit massiven ökonomischen Verlusten. Diese sind begründet in Wachstumsdepression, schlechter Futterverwertung und langwieriger Futtermedikation (McOrist, 2010).

*B. pilosicoli* verursacht die Porcine intestinale Spirochätose, die durch milde Durchfallssymptomatik mit verringerten Tageszunahmen gekennzeichnet ist. Die anderen genannten Spezies können als Sekundärerreger bei Colitiden isoliert werden. *B. intermedia* wird als apathogener Begleitkeim im Schweinedickdarm angesehen.

Alle *Brachyspira* spp. erreichen eine Länge von 5-11 µm und sind 0,2-0,4 µm breit. Wie bei anderen Spirochäten inserieren auch bei Brachyspiren an jedem Zellende periplasmatische Flagellen, die sie zur aktiven Bewegung befähigen. Somit ist es ihnen möglich, sich durch viskösen Darminhalt und Mucus fortzubewegen.

Die Größe des Genoms variiert innerhalb der Brachyspiren von 2,5-3,2 Mbp, jedes mit über 2300 Protein-kodierenden Sequenzen. Sequenzen des vollständigen Genoms sind mittlerweile für *B. hyodysenteriae* (Gen®Bank Accession No: 706763.1), *B. murdochii* (Gen®Bank Accession No: 014150.1), *B. intermedia* (Gen®Bank Accession No: 017243.1) sowie *B. pilosicoli* (Gen®Bank Accession No: 014330.1) veröffentlicht.

Brachyspiren sind strikte Anaerobier. Durch ihr langsames Wachstum werden sie schnell von anderen anaeroben Darmbakterien überwuchert, weshalb man sie auf Selektivnährmedien mit antibiotischen Zusätzen anzüchtet.

Bakterienwachstum wird häufig erst nach 5 Tagen bei 37-42°C sichtbar. Es zeigt sich ein ebener, flacher Bakterienrasen, umgeben von einer Zone starker ( $\beta$ ) Hämolyse, die nur bei *B. hyodysenteriae* und *B. suanatina* zu sehen ist. Alle anderen *Brachyspira* spp. produzieren eine unvollständige Hämolyse (Hampson, 2012).

## 2.2 *B. hyodysenteriae*

### 2.2.1 Charakteristika

*B. hyodysenteriae* ist ein gram-negatives, anaerob wachsendes Bakterium. Unter dem Mikroskop erscheint es länglich und spiralförmig. Periplasmatische Flagellen umschließen den protoplasmatischen Zylinder. Die gesamte Zelle ist von einer losen, äußeren Membran umhüllt.

Die äußere Membran beinhaltet Lipooligosaccharide (LOS), die einen ähnlichen Aufbau wie Lipopolysaccharide haben (Halter und Joens, 1988) und als Grundlage zur Unterteilung von Serotypen und Serogruppen von Brachyspiren herangezogen wurden. 11 Serogruppen wurden auf dieser Basis etabliert, allerdings sind auch nicht typisierbare Isolate beschrieben (Hampson et al., 1997). Für die Herstellung protektiver Vakzinen wurden äußere Membran- und Lipoproteine identifiziert. Das rasch zunehmende Interesse an Membran- bzw. Lipoprotein-kodierenden Genen und die neue Einordnung des Bakteriums aus der Gattung *Serpulina* zu *Brachyspira* führten zu einer uneinheitlichen Nomenklatur (Hampson und La, 2006). Durch deren Standardisierung wurden die gut charakterisierten äußeren Membranproteine (OMP) BmpA und BmpB in bhlp16 und bhlp29,7 umbenannt (Hampson und La, 2006; Lee et al., 2000). Die OMPs von *B. hyodysenteriae* sind an der Adhärenz an Darmepithelzellen mitbeteiligt (Richter et al., 2008). Zusätzlich werden Antikörper gegen die OMPs gebildet, die die Adhärenz der Bakterien in vitro serotypübergreifend zu inhibieren scheinen.

### 2.2.2 Genetische Eigenschaften

*B. hyodysenteriae* besitzt ein zirkuläres, 3,0-3,2 Mbp großes Chromosom. In dem vollständig sequenzierten Stamm WA-1 konnte zum ersten Mal ein ca. 36 Kbp großes, zirkuläres Plasmid, das 31 Gene beinhaltet, nachgewiesen werden. Hiervon beteiligen sich anscheinend 6 Gene (rfbA-D) an der Rhamnose Biosynthese und demzufolge an der Synthese der LOS (Bellgard et al., 2009). Weitere Untersuchungen zeigten, dass plasmidtragende Stämme weit verbreitet sind. In einem Infektionsversuch mit WA-1 und einem *B. hyodysenteriae*-Stamm, der kein Plasmid trägt (WA-400), wurde gezeigt, dass der WA-1 Stamm deutlich häufiger (92 %) Dysenterie als der WA-400 Stamm (54 %) hervorrief. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die plasmidkodierte Gene für die Entstehung und Ausprägung des Krankheitsgrades relevant sind (La et al., 2011). Datenbankvergleiche von WA-1 zeigten, dass diverse Proteine von *B. hyodysenteriae* eine höhere Ähnlichkeit zu *Escherichia (E.) coli* und Clostridienspezies als zu anderen Spirochäten haben (Bellgard et al., 2009). Daher wird ein reger horizontaler Gentransfer angenommen.

Weiterhin ist ein transduzierender Bakteriophage VSH-1 beschrieben. Dieser kann 7.5 kb-große Genfragmente zwischen *B. hyodysenteriae*-Stämmen übertragen (Matson et al., 2005; Motro et al., 2009).

Neuere Studien belegen innerhalb der Spezies eine große genetische Diversität der Stämme. Molekulare Untersuchungen zeigen, dass neue Varianten von Stämmen in gleichen Betrieben entstehen, was darauf hindeutet, dass neben Mutationen auch Bakteriophagen durch Transduktion (Rekombination) neuer Genfragmente an dieser Mikroevolution beteiligt sind. Diese neuen Stämme können veränderte Eigenschaften aufweisen, wie beispielsweise eine veränderte antimikrobielle Empfindlichkeit oder Virulenzeigenschaft (Hidalgo et al., 2010; La et al., 2009; Råsbäck et al., 2007).

### 2.2.3 Verbreitung

*B. hyodysenteriae* ist weltweit verbreitet. Epidemiologische Studien wurden mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mikrobieller Anzucht oder serologisch durchgeführt.

1993 waren 11-33 % der Herden in den Vereinigten Staaten von Amerika serologisch positiv. Aufgrund verbesserter Produktionssystemen und optimierten Hygienemanagements sowie

durch den routinemäßigen Einsatz von Carbadox in vielen Staaten der USA kam es vorübergehend zu reduzierten Infektions- und Erkrankungsraten. Allerdings lässt sich neuerdings ein Wiederaufflammen der Erkrankung in Nordamerika feststellen (Hampson, 2012).

Mittels PCR wurden weltweit *B. hyodysenteriae*-Prävalenzen ermittelt. In Korea waren 37,2 % der gesammelten Kotproben aus Betrieben mit Durchfallhistorie positiv (Suh und Song, 2005b). In Polen, Ungarn und Spanien wurden Prävalenzen zwischen 34,8 % und 45,2 % in Betrieben mit Durchfallssymptomatik ermittelt. Die innerbetriebliche Herdenprävalenz lag zwischen 12,4 % und 45,5 % (Biksi et al., 2007; Carvajal et al., 2006; Plawinska et al., 2004). In Studien aus Deutschland waren 18-46 % der Proben durchfallerkrankter Tiere und 6,7 % der Proben klinisch gesunder Tiere positiv (Herbst et al., 2004; Nathues et al., 2007; Ritzmann et al., 2009). Herden mit Diarrhoehistorie in Süddeutschland, beprobt zwischen 2007 und 2009 waren zu 24,2 % positiv (Reiner et al., 2011a).

In australischen verwilderten Schweinen konnte *B. hyodysenteriae* ebenfalls mittels PCR mit einer Prävalenz von 8,1 % aus Kolongewebe bzw. Kot nachgewiesen werden (Phillips et al., 2009). Auch für Deutschland ist das Vorkommen von *B. hyodysenteriae* in Wildschweinen mit einer geringeren Prävalenz von 2,4 % nachgewiesen (Reiner et al., 2011b).

Mittels bakterieller Anzucht und biochemischer Differenzierung konnte *B. hyodysenteriae* zwischen 1997 und 1999 in Großbritannien zu 13 % als alleiniger Verursacher von Diarrhoe und in weiteren 16 % der Fälle als Koerreger nachgewiesen werden (Thomson et al., 2001).

In Dänemark wurden Prävalenzen von 2,5 % in zufällig beprobten Herden bakteriologisch nachgewiesen, während die innerbetriebliche Herdenprävalenz bei 25-30 % lag (Stege et al., 2000).

#### 2.2.4 Infektionsquellen

Die Aufnahme von erregerhaltigem Kot ist in infizierten Herden eine häufige Infektionsquelle. Dieser Infektionsweg ist insbesondere in Betrieben mit kontinuierlicher Belegung häufig (Hampson, 2012).

*B. hyodysenteriae* kann auch durch Personenverkehr zwischen infizierten und nicht infizierten Gruppen verbreitet werden. In älteren Standorten sammeln Güllekanäle häufig die Exkrete

aus mehreren Abteilen, so können Fliegen die Erreger aus dem Kanal in nicht infizierte Tiergruppen verschleppen (Glock et al., 1975).

Der Erreger überlebt in kontaminierter Erde für 10 Tage bei 10°C. Wenn 10% Schweinekot zugesetzt wird, sind es 78 Tage und 112 Tage in reinem Schweinekot (Boye et al., 2001).

Auch Wild- und Haustiere stellen eine Infektionsquelle dar, wobei Mäuse ein größeres Risiko als Ratten darstellen, da diese den Erreger nach experimenteller Infektion deutlich länger (180 Tage) mit dem Kot ausscheiden. Experimentell erkrankten Schweine 11 Tage nach dem ersten Kontakt mit infiziertem Mäusekot an Dysenterie (Joens und Kinyon, 1982).

Viele neue Ausbrüche kommen durch asymptomatische, zugekaufte Trägartiere zustande, die weder in Quarantäne waren, noch während der Zeit der Einstellung behandelt wurden (Hampson und La, 2006).

### 2.2.5 Pathogenese der Dysenterie

Die Pathogenese der Dysenterie ist komplex und im Detail noch nicht geklärt. Eine Besonderheit ist, dass einige anaerobe Bakterien der normalen Darmflora Synergien mit *B. hyodysenteriae* eingehen indem sie die Kolonisation, Entzündungen und Läsionen begünstigen (Whipp et al., 1979; Joens et al., 1981).

*B. hyodysenteriae* wird oral über kontaminierten Kot aufgenommen und überlebt, geschützt durch anhaftenden Schleim, teilweise die Magenpassage. Im Darm folgt der Anaerobier einem chemotaktischen Gradienten durch viskösen Mucus. Eine Vielzahl von Genen sind für die Beweglichkeit und Chemotaxis der Brachyspiren verantwortlich (Bellgard et al., 2009). Durch Manipulation von Flagellengen konnte in vitro die Beweglichkeit gehemmt werden, was mit einer deutlichen Herabsetzung der Kolonisationsfähigkeit einherging. Aus Australien sind avirulente Isolate beschrieben, die zwar den Darm besiedeln, allerdings nicht zur Erkrankung führen (Lee et al., 1994; Thomson et al., 2001). Diese Isolate zeigen zum Teil eine herabgesetzte Motilität, anderen fehlt das *mglB*-Gen, welches das Glucose-Galactose Lipoprotein kodiert, das wichtige chemotaktische Eigenschaften zu besitzen scheint. Bei der Besiedlung des Darms muss der Anaerobier die potentielle Sauerstofftoxizität umgehen. Durch die NADH-Oxidase (*nox*-Gen) können Brachyspiren Sauerstoff zu Wasser metabolisieren und somit geringe Mengen Sauerstoffs tolerieren. Ein inaktiviertes *nox*-Gen reduziert die Fähigkeit zur Kolonisation und vermindert so die Virulenz (Stanton et al., 1999).

In infizierten Tieren finden sich die Spirochäten dicht an den Epithelzellen im Lumen und den Krypten von Caecum und Colon. (Wilcock und Orlander 1979). Sie stimulieren die vermehrte Freisetzung von Mucus ins Lumen. Klinische Symptome und Darmschädigung treten bei einer Bakteriendichte von  $10^6/\text{cm}^2$  Mucosa auf, wobei eine enge Korrelation zwischen Erregermenge und Dickdarmschädigung im Mäusemodell gezeigt werden konnte (Davis et al., 2005; Hughes et al., 1977; Whipp et al., 1979). Die Spirochäten sind im Kot 1-4 Tage vor dem Auftreten der ersten Krankheitssymptome nachweisbar (Kinyon et al., 1977). Im Verlauf der Pathogenese verändert sich die Zusammensetzung der Mikroflora von vornehmlich gram-positiven Bakterien bei gesunden Tieren zu gram-negativen Bakterien bei dysenterieerkrankten Tieren (Pohlenz et al., 1983).

Es ist nicht bekannt, ob das Anhaften an Epithelzellen eine wichtige Voraussetzung für die Entstehung der Erkrankung ist. Obwohl *B. hyodysenteriae* in Epithelzellen, besonders in Becherzellen und der Lamina propria von erkranktem Gewebe zu finden ist, scheint die Invasion nicht essentiell für die Produktion der typischen Läsionen zu sein (Glock et al., 1974).

Die Mechanismen der Gewebeschädigung bei Dysenterie sind nicht gänzlich geklärt, Hämolsine und Lipooligosaccharide (LOS) scheinen jedoch eine wesentliche Rolle zu spielen. Experimentell können die Läsionen, wie sie bei Dysenterie zu finden sind, durch Zugabe von Hämolsinen erzeugt werden (Hutto und Wannemuehler, 1999). Zunächst schienen die Gene *tlyA*, *tlyB* und *tlyC* mutmaßliche Hämolsine zu kodieren. Neuere Arbeiten zweifeln die Relevanz der *tly*-Gene an und machen ein 8,93 kDa großes Polypeptid, das von einem gänzlich anderen Gen, nämlich *hlyA* kodiert wird, für die hämolytische Aktivität verantwortlich (Hsu et al., 2001). Es scheint, als seien die *tly*-Gene regulatorische Elemente. Ihre Inaktivierung führt zu herabgesetzter Virulenz und Hämolyse (Hyatt et al., 1994). In neueren Untersuchungen an *B. hyodysenteriae* WA-1 konnten drei weitere mögliche Hämolsingene detektiert werden (Bellgard et al., 2009).

Die Bedeutung der Lipooligosaccharide (LOS) von *B. hyodysenteriae* für die Pathogenese und für Darmläsionen wird kontrovers diskutiert. Aus neueren Studien geht hervor, dass extrahierte LOS von *B. hyodysenteriae* lokale Entzündungen und Gewebeschädigungen durch die Hochregulation verschiedener Cytokine und Chemokine wie Interleukin-1 $\beta$ , Interleukin-10 und TNF $\alpha$  im Dickdarm bewirken können (Kruse et al., 2008).

Durch Schädigung der epithelialen Barriere im Darm infolge der Hämolsine und LOS, scheint die Invasion der Spirochäten sowie anderer Bakterien und Protozoen wie *Balantidium coli* begünstigt. *B. hyodysenteriae* und deren typische Läsionen sind nur bis zur Lamina

propria zu finden. Das zeigt, dass sich die gesamte Pathogenese der Erkrankung auf das Epithel beschränkt (Kinyon et al., 1980). Die systemischen Erscheinungen bei Dysenterie sind auf Flüssigkeitsmangel und Elektrolytentgleisung zurückzuführen. Der Flüssigkeitsverlust ist im Sinne einer sekretorischen Diarrhoe Folge einer gestörten Absorption aus dem Kolon, da die epithelialen Transportmechanismen für Flüssigkeit und Chloridionen vom Lumen ins Blut gestört sind (Argenzio et al., 1980; Waldmann und Lindemann, 1991). Die Ursache für perakute Todesfälle ist nicht geklärt, scheint aber mit der Freisetzung von bakteriellem Endotoxin zusammen zu hängen.

Andere mögliche Virulenzfaktoren sind Proteasen. Innerhalb des Genoms von WA-1 konnten insgesamt 15 Gene für Proteasen identifiziert werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese an der Gewebeschädigung des Wirtes beteiligt sind (Bellgard et al., 2009).

### 2.2.6 Kultur und Identifikation

Die anaerobe mikrobiologische Kultivierung von *B. hyodysenteriae* aus Kotproben oder Kolonmukosa mit anschließender Charakterisierung der phänotypischen Eigenschaften wird häufig als Diagnostikmethode herangezogen, insbesondere, weil sie die Anfertigung eines Resistenztests erlaubt.

Für die erfolgreiche Anzucht ist zunächst die rektale Entnahme von Probenmaterial mit anschließendem Transport in geeigneten Medien entscheidend (Verspohl et al., 2001; Waldmann et al., 2000). Der Erfolg der Anzucht kann nach vorhergehender Inkubation in Selektivbouillon verbessert werden (Calderaro et al., 2005).

Die Zugabe von 1 % Sauerstoff zur anaeroben Kultur verstärkt das Wachstum (Stanton et al., 1997).

*B. hyodysenteriae* wächst langsam bei einer Temperatur von 37-42°C auf Tryptikase-Soja Agar, versetzt mit 5-10 % Blut (für gewöhnlich Schaf- oder Rinderblut) (Fossi et al., 1999; Molnár, 1996; Oxberry und Hampson, 1998; Rønne und Szancer, 1990). Antimikrobielle Zusätze verhindern eine Überwucherung durch die Begleitflora. Zunächst wurde der Agar mit Spectinomycin (400 µg/ml), Vancomycin und Colistin (je 25 µg/ml) versetzt, später kamen die Antibiotika Spiramycin (25 µg/ml) und Rifampicin (12,5 µg/ml) hinzu, die die Selektivität des Agars weiter steigern konnten und eine Reduktion der Menge an Antibiotika ermöglichten

(Achacha und Messier, 1992; Duhamel und Joens, 1994; Jenkinson und Wingar, 1981; Kunkle und Kinyon, 1988).

Nach 3-10-tägiger Inkubation der Platten wird das Wachstum der *Brachyspiren* sichtbar (Barcellos et al., 2000; Feltrup et al., 1999; Hommez et al., 1998; Verspohl et al., 2001). Für gewöhnlich erkennt man schon nach 3-5 Tagen einen dünnen Film auf der Oberfläche der Platten, der von einer Zone vollständiger Hämolyse umgeben ist. Neben *B. hyodysenteriae* ist die Produktion einer vollständigen Hämolyse nur für *B. suanatina* bekannt. Die anderen *Brachyspira* spp. produzieren lediglich eine unvollständige Hämolyse.

Akut infizierte Schweine scheiden den Erreger in Mengen von bis zu  $10^8$  bis  $10^9$  Keimen pro Gramm Kot aus. Die Angaben über die Nachweisgrenze in der Kultur schwanken erheblich zwischen einer Erregermenge von  $10^3$  KbE/g Kot bzw.  $10^2$  bis  $10^7$  KbE/g Kot und hängen entscheidend vom verwendeten Medium und der Vorinkubation ab (Calderado et al., 2005; Råsbäck et al., 2005). Asymptomatische Träger scheiden teilweise nur intermittierend aus. Eine vorangegangene Medikation kann die Ausscheidung unter ein detektierbares Level reduzieren, was häufig zu falsch negativen Ergebnissen führt.

### Phänotypische Speziesdifferenzierung

Nach einer gelungenen Anzucht werden Kulturen mit vollständiger Hämolyse auf ihre biochemischen Eigenschaften hin untersucht. Hierfür werden reine Kulturen benötigt, die durch mehrere Passagen aufwendig zu erreichen sind. Zudem kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass sich noch andere *Brachyspira* spp. auf der Platte befinden.

Für die weitere Differenzierung sind Indolbildung, Hippuratspaltung,  $\alpha$ -Galaktosidaseaktivität und  $\alpha$ - und  $\beta$ -Glucosidaseaktivität zu testen (Fellström et al., 1997; Feltrup et al., 1999; Stanton et al., 1997).

Es sind jedoch atypische Isolate beschrieben, die nicht den erwarteten biochemischen Reaktionen entsprechen, wie indolabbauende- und nicht abbauende Stämme von *B. hyodysenteriae* (Fellström et al., 1999).



### 2.2.7 Nukleinsäurebasierte Nachweisverfahren

Die PCR ist in der Routinediagnostik zum Nachweis von *B. hyodysenteriae* gut etabliert und bietet einen hochsensitiven und zugleich hochspezifischen Nachweis. Falsch negative Ergebnisse durch unsachgemäße Probennahme oder Transport spielen keine Rolle, da die DNA lebender sowie abgestorbener Bakterien detektiert wird. Die Zeitersparnis im Vergleich zur Anzucht ist ein weiterer Vorteil der PCR.

Der bedeutendste Nachteil dieser Methode ist die fehlende Möglichkeit zur Resistenzbestimmung.

Während früher üblicherweise Material vom ersten Plattenausstrich untersucht wurde, ist die direkte Detektion aus Kotproben nach DNA-Isolierung heute Standard. Die am häufigsten genutzten Sequenzen liegen im 23S rRNA-Gen sowie im *nox*-Gen (Barcellos et al., 2000; Rohde et al., 2002).

Eine weitere PCR-basierte Methode, die zur Speziesdifferenzierung genutzt werden kann, ist der Restriktionsenzym-Verdau nach vorhergehender Amplifikation spezifischer Genfragmente. Das anschließende gelelektrophoretische Bandenmuster ist spezies-spezifisch. Die 16S und 23S rRNA-Gene und das *nox*-Gen wurden mit dieser Methode bereits untersucht (Barcellos et al., 2000; Rohde et al., 2002; Stanton et al., 1997; Thomson et al., 2001). In Großbritannien sind atypische Isolate gefunden worden, die keine Amplifikate in der 23S rRNA-PCR bringen (Thomson et al., 2001). Mittlerweile konnten die PCR-Methoden optimiert werden, sodass in einer Duplex-PCR gleichzeitig *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* aus Kotproben nachgewiesen werden können (La et al., 2003).

Die Entwicklung einer Multiplex-PCR für den simultanen Nachweis von *B. hyodysenteriae*, *B. pilosicoli* und *L. intracellularis* als die 3 wichtigsten differentialdiagnostischen Erreger brachte einen noch schnelleren und effizienteren Nachweis (Elder et al., 1994, La et al., 2006; Nathues et al., 2007, Phillips et al., 2009; Suh und Song, 2005a). Eine Weiterentwicklung war die Etablierung einer Multiplex real time PCR, die nicht nur gleichzeitig Lawsonien, *B. pilosicoli* und *B. hyodysenteriae* detektieren, sondern zugleich quantifizieren konnte (Willems und Reiner, 2010). Ein Zusammenhang zwischen Erregermenge und Krankheitsgrad ist sowohl für *L. intracellularis* als auch für *B. hyodysenteriae* belegt (Davis et al., 2005).

Mit dieser Methode können Diagnosen unter Berücksichtigung der wichtigen Differentialdiagnosen noch am Tag der Einsendung gestellt werden.

Insbesondere bei Erregern, die schwierig anzuzüchten sind, ist der Vorteil der Detektion nicht vermehrungsfähiger Erreger mittels PCR von großer Bedeutung.

### **2.2.8 Therapie und Bekämpfung der Dysenterie**

Die Art der Verabreichung der Antibiotika ist ein wichtiger Gesichtspunkt. Schwer betroffene Tiere benötigen so lange eine parenterale Behandlung, bis die Futteraufnahme gesichert ist und sie so auf enteralem Wege die entsprechenden Dosen aufnehmen. In den meisten Fällen wird parallel zur Einzeltierbehandlung über das Trinkwasser oder Futter therapiert. Zur Vermeidung von Resistenzentwicklung und Rezidiven ist eine ausreichend lange Therapie über 21 Tage erforderlich (Ritzmann et al., 2009). Bei akutem Krankheitsausbruch muss stets freier Zugang zu Trinkwasser, mit oder ohne Elektrolytzusatz möglich sein. Neben der antimikrobiellen Behandlung muss das Management angepasst werden, um Reinfektionen therapierter Tiere und Infektionen anderer Tiergruppen zu verhindern. Rein-Raus Belegung und gründliche Reinigung und Desinfektion von Abteilen vor Neubelegung ist essentiell. *Brachyspira* spp. sind gegen viele herkömmliche Wirkstoffgruppen in Desinfektionsmitteln empfindlich, wie z.B. Natronlauge oder Formalin (1-2 %) (Selbitz, 2002). Auch die Bekämpfung von Vektoren wie z.B. Fliegen und Schadnagern muss penibel durchgeführt werden. Nach der Ausstallung sollte die Gülle abgelassen und die Desinfektion aller Flächen und des Güllekanals mit Cyanamid (Alzogur®) durchgeführt werden. Durch die Desinfektion mit Cyanamid werden auch Fliegenlarven miterfasst. Idealerweise sollte eine infizierte Gruppe nach Beendigung der Therapie in ein sauberes Abteil umgestallt werden, um den Infektionszyklus zu durchbrechen. Dies ist jedoch üblicherweise nur in chronisch verseuchten Ferkelerzeugerbetrieben mit geplanten Sanierungsmaßnahmen möglich. Die Verwendung von Desinfektionswannen und die Reinigung von Arbeitsmaterialien sowie das Wechseln der Schutzkleidung zwischen getrennten Einheiten stellen wichtige Präventivmaßnahmen dar. Da die Erkrankung häufig durch Stress begünstigt wird, sollten Stresssituationen wie Überbelegung, Umstallen oder Futterwechsel minimiert werden.

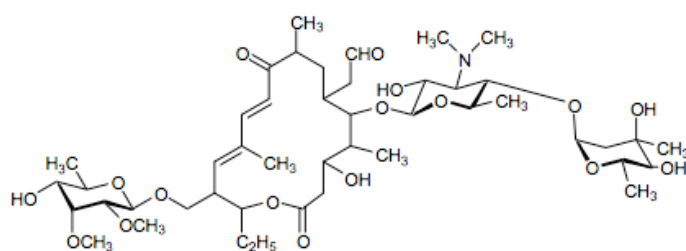
### 2.2.8.1 Wirkstoffe

Derzeit stehen in Deutschland nur 3 Wirkstoffgruppen zur Behandlung der Dysenterie zur Verfügung: Makrolide, Lincosamide und Pleuromutiline (Ungemach et al., 2010). Alle Gruppen binden an die große (50S) Untereinheit des Ribosoms.

### 2.2.8.2 Makrolide

Die makrozyklischen Laktone sind lipophile Substanzen mit einem zentralen 14-16-gliedrigen Laktonring. Früher wurden Makrolide aus *Streptomyces* (*S.*) Arten gewonnen, wobei als erster Vertreter Erythromycin 1952 aus *S. erythreus* isoliert wurde. Später wurden Makrolide halb- oder vollsynthetisch hergestellt. Die Makrolide werden gegen grampositive, einige gramnegative und zellwandlose Bakterien wie Mykoplasmen eingesetzt (Kroker et al., 2002). Tylosin ist ein älterer Vertreter dieser Klasse und wurde erstmals aus einer Bodenprobe in Thailand aus *S. fradiae* isoliert (Harvey et al., 1995). Chemisch handelt es sich um einen 16-gliedrigen Laktonring mit den 3 Zuckern Mycinose, Mycaminose und Mycarose (Abbildung 1) (Spoo und Riviere, 1995). Tylosin ist eine schwache Base. Es wird als Salz (z.B. Tartrat, Phosphat) verwendet und ist in diesen Formulierungen im Vergleich zur lipophilen Reinsubstanz gut wasserlöslich (Ungemach et al., 2010). Tylosinphosphat wird deutlich schlechter aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert als Tylosintartrat (Waldmann und Plonait, 2004).

Die klassischen Makrolide wie Tylosin müssen von neueren Formulierungen, wie dem Tylvalosin (Acetylisovaleryltylosin), unterschieden werden. Neue Formulierungen werden insbesondere bei mangelnder Wirksamkeit anderer verfügbarer Chemotherapeutika gegen *B. hyodysenteriae* eingesetzt. Für Tylvalosin wurden beim Vorliegen von Resistenzen gegenüber anderen Makroliden erhöhte MHK-Werte bestimmt. Somit können Kreuzresistenzen zu anderen Makrolid-Antibiotika nicht ausgeschlossen werden (Angaben des Herstellers).



Tylosin

**Abbildung 1:** Strukturformel des Makrolid- Antibiotikums Tylosin (16-gliedriger Lakton-Ring, 3 Zucker).

### 2.2.8.3 Bindung von Makroliden an das bakterielle Ribosom

Die ribosomale Proteinbiosynthese ist ein komplexer Prozess. Die Verknüpfung von Aminosäuren zu Peptiden erfordert eine korrekte Positionierung der 3'-Enden zweier tRNAs in der 50S ribosomalen Untereinheit, um die Interaktion zwischen der Peptidyl-tRNA in der ribosomalen P-Bindungsstelle und der Aminoacyl-tRNA in der A-Bindungsstelle zu gewährleisten (Vester und Douthwaite, 2001).

Die Makrolide binden an den Teil der 50S Untereinheit des Ribosoms, an dem die Aminoacyl- und Peptidylenden der tRNAs enzymatisch miteinander verknüpft werden, bzw. die wachsende Peptidkette durch einen Tunnel das Ribosom verlässt. In den Tunnel ragen die ribosomalen Proteine L4 und L22 hinein. Mutationen in den Proteinen wurden bereits mit Resistenzen gegenüber Erythromycin in vitro in Verbindung gebracht (Pardo und Rosset, 1977; Chittum und Champney, 1994). Die Autoren nehmen an, dass Konformationsänderungen in den Proteinen zu einer veränderten Faltung der 23S rRNA und einer geringeren Bindungsaffinität des Antibiotikums führen. Erythromycin bindet für gewöhnlich gleichzeitig an Domäne II (Haarnadelstruktur 35) und Domäne V der 23S rRNA. In dem L22 mutierten Stamm ist die Faltung der Domäne II verändert. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Bindungstasche für Makrolid-Lincosamid-Streptograminb-Antibiotika (MLSb) durch die Faltung der 23S rRNA bestimmt wird. Die 16-gliedrigen Makrolide (Tylosin) gehen mehr Bindungen mit Teilen der 23S rRNA ein, als die 14-gliedrigen Makrolide (Erythromycin). Eine Mutation im Nukleotid 2032 (Haarnadelstruktur

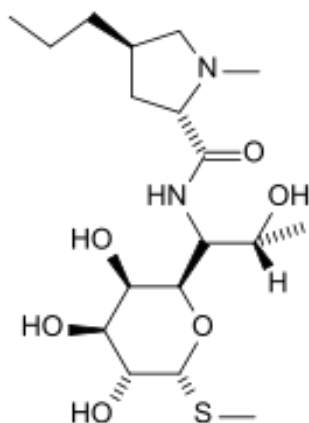
72) ist zudem mit Resistenzen gegenüber Lincosamiden in Verbindung gebracht worden, während die Mutation die Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin verstärkt und die Struktur der Domäne V der 23S rRNA verändert (Übersicht bei Vester und Douthwaite, 2001).

Tylosin wirkt wie alle Makrolide bakteriostatisch, hat aber in höheren Konzentrationen einen bakteriziden Effekt. Dies beruht auf den verschiedenen Wirkungsmechanismen. Makrolide binden an die P-Bindungsstelle des Ribosoms. Somit wird die Translokation der Peptidyl-tRNA von der A-Bindungsstelle an die P-Bindungsstelle blockiert. Die unfertige Peptidkette wird dadurch aus dem Ribosom verdrängt. Ein weiterer Wirkmechanismus liegt in der Blockierung der Peptidyltransferase, die die Peptidbindung zwischen den Aminosäuren in der A- und P-Bindungsstelle katalysiert. Eine Blockade der Bindung der Aminoacyl-tRNA ist ebenfalls beschrieben (Furneri und Nicoletti 1991; Gaynor und Mankin, 2003; Mazzei et al., 1993).

#### **2.2.8.4 Lincosamide**

Die Lincosamide bestehen aus 2 Heterocyclen, einem Derivat der Aminosäure Prolin und einem schwefelhaltigen Aminozyucker-Galacto-Octapyranring, die über eine Amidbindung verknüpft sind (Abbildung 2) (Kroker et al., 2002). Sie werden in der Leber verstoffwechselt und über die Galle und die Nieren ausgeschieden. Lincomycin ist in Deutschland als Mono- und Kombinationspräparat für die Veterinärmedizin zugelassen. Für humanmedizinische Anwendungen ist Lincomycin nur in den USA und Kanada zugelassen.

Lincosamide haben einen ähnlichen Wirkmechanismus wie Makrolide. Die Bindungsstellen an der 50S Untereinheit des Ribosoms überlappen, wodurch entsprechende Wechselwirkungen und Kreuzresistenzen auftreten (Karlsson et al., 1999).



**Abbildung 2:** Strukturformel des Lincosamid- Antibiotikums Lincomycin: ein Propylprolin mit dem Aminozyucker Methylthiolincosaminid (oberer Bildteil).

#### 2.2.8.5 Pleuromutiline

Die Pleuromutilinderivate wurden ursprünglich von der natürlich vorkommenden Basidiomycete *Pleurotus mutilus* isoliert (Bøsling et al., 2003; Pringle et al., 2004).

Tiamulin und Valnemulin sind die einzigen verfügbaren Vertreter der Pleuromutilinderivate in der Veterinärmedizin (Schlünzen et al., 2004).

Das Zielkeimspektrum umfasst sowohl intestinale als auch pulmonale Pathogene wie *Brachyspira* spp., *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma* spp., und *Pasteurella multocida* (Long et al., 2009).

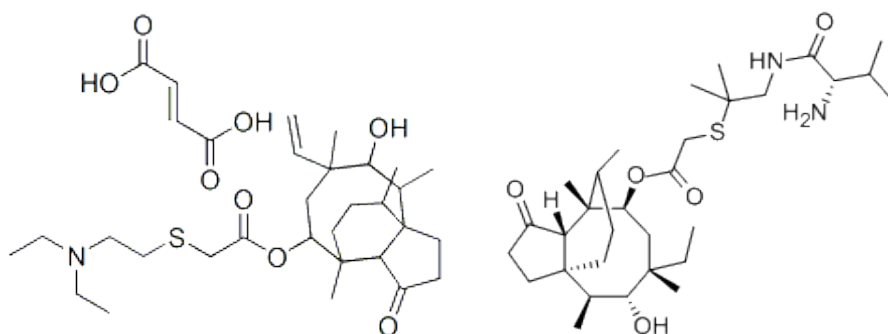
Tiamulin ist ein semisynthetisches Derivat, das aus einem trizyklischen Mutilin-Kern (Cyclo-Pentanon, Cyclo-Hexyl und Cyclo-Octan) mit einer aliphatischen Thioether-Seitenkette aufgebaut ist (Abbildung 3) (Schlünzen et al., 2004).

Die Summenformel lautet  $C_{28}H_{47}NO_4S$ , wobei die Stickstoffkomponente im Molekül die Wasserlöslichkeit beeinflusst und ein besseres Eindringen in das Gewebe erlaubt. Nach oraler Gabe wird Tiamulin in Form von Hydrogenfumarat - in Wasser gelöst - mit über 90 % sehr gut absorbiert (Demuth und Müntener, 2008). Nach 2-4 Stunden wird die maximale Serumkonzentration erreicht. Tiamulin wird zu 99 % metabolisiert und über Galle, Kot und Harn ausgeschieden.

Bei parenteraler Applikation werden zur Behandlung der Dysenterie 10-12 mg/kg KGW, bei enteraler Applikation 10 mg/kg KGW empfohlen.

Valnemulin besitzt eine sehr ähnliche chemische Struktur. Es unterscheidet sich von Tiamulin nur durch die längere Extension (Abbildung 3).

Mit Retapamulin steht seit November 2007 erstmals ein Vertreter der Pleuromutiline zur Therapie in der Humanmedizin zur Verfügung. Aufgrund der fortschreitenden Resistenzentwicklung müssen ständig neue Wirkstoffe entwickelt werden. In vitro konnte bereits eine gute Wirksamkeit gegen Methicillin empfindliche- sowie resistente Staphylokokken gezeigt werden, die sich allerdings in vivo nicht bestätigen ließ (Europäischer öffentlicher Zulassungsbericht: Altargo®; 2007).

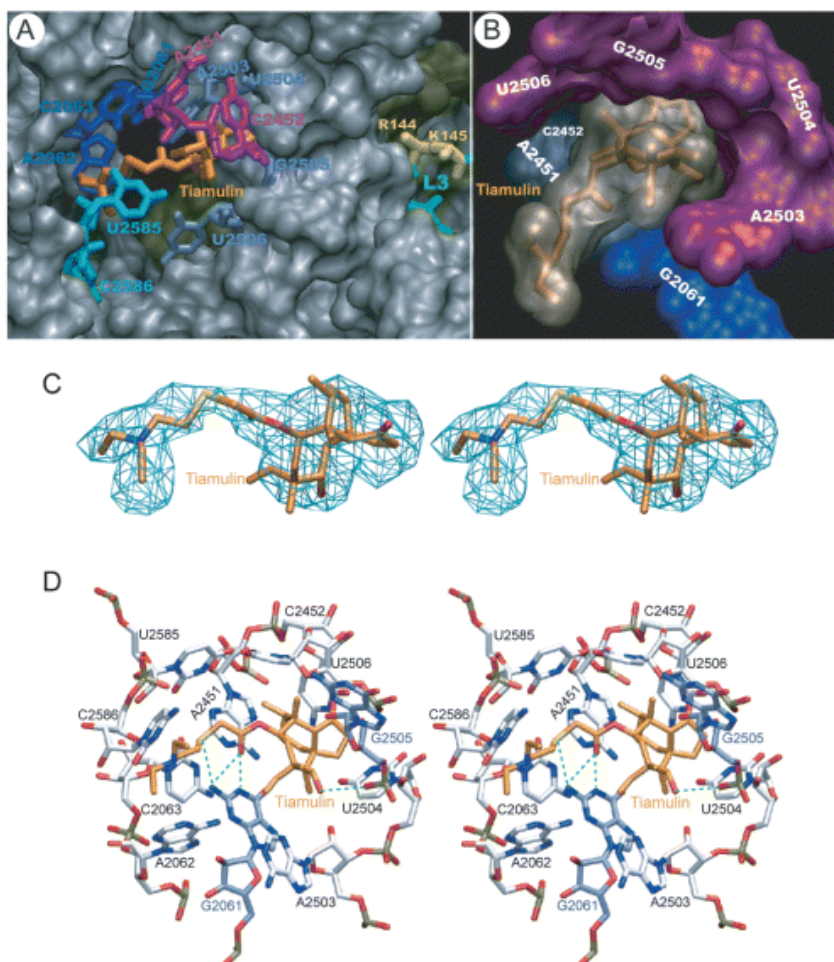


**Abbildung 3:** Die Strukturformeln der Pleuromutilinderivate Tiamulin (-fumarat) (linke Bildhälfte) und Valnemulin (Trizyklischer Mutilinkern mit aliphatischer Seitenkette) (rechte Bildhälfte).

#### 2.2.8.6 Bindung von Pleuromutilinen an das bakterielle Ribosom

Pleuromutiline binden an das Peptidyltransferasezentrum. Röntgen-Kristallstruktur-Analysen einer 50S ribosomalen Untereinheit (2,4 Å) und eines 70S-Ribosoms mit tRNAs in einer 5,5-Å-Auflösung zeigen die molekularen Details dieser Struktur (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000). Sie besteht aus 23S rRNA und ist von zahlreichen ribosomalen Proteinen umgeben. Eine Sonderstellung nimmt das Protein L3 ein, das mit einem verlängerten Arm bis ins Peptidyltransferasezentrum hineinreicht. Frühere Hinweise der Vernetzung von tRNAs und der 23S rRNA als Angriffspunkt verschiedener Proteinbiosyntheseinhibitoren konnten bestätigt werden. Über „Footprint“-Analysen wurden auch die Bindungsstellen und Wechselwirkungen von Pleuromutilinen an das Ribosom gezeigt. Tiamulin geht im *Deinococcus radiodurans*-Modell hydrophobe Wechselwirkungen mit folgenden Nukleotiden der Domäne V der 23S rRNA ein (G2061, A2062, C2063, A2451, C2452, A2503, U2504,

G2505, U2506, U2585 und C2586) (*E. coli*-Nummerierung). Außerdem werden Wasserstoffbrückenbindungen zu G2061 und U2585 ausgebildet (Abbildung 4) (Schlünzen et al., 2004).



**Abbildung 4:** Tiamulin bindet im Peptidyltransferasezentrum, am Eingang des ribosomalen Tunnels. Dabei ist der Mutilin-Kern fest in der A-tRNA Bindungstasche an folgende Nukleotide gebunden : G2061, A2451, C2452, A2503, U2504, G2505, U2506 (*E. coli*-Nummerierung). Die Extension reicht bis auf die andere Seite des Tunnels, wo sie mit der P-tRNA Bindungsstelle überlappt (nach Schlünzen et al., 2004).

In *E. coli* wurden Footprints an A2058/2059, U2506 und U2584/2585 für beide Pleuromutilinderivate gezeigt. Die Positionen A2058/2059 sind zudem entscheidend für die MLSb-Resistenzen. Während Tiamulin, Valnemulin, die Streptogramine und Chloramphenicol die Mutationsrate dieser Nukleotide erhöhen, schützen Makrolide und Lincosamide diese Nukleotide in unterschiedlichem Ausmaß (Poulsen et al., 2001). Erythromycin kann gleichzeitig mit den Pleuromutilinen binden. Da Erythromycin ein

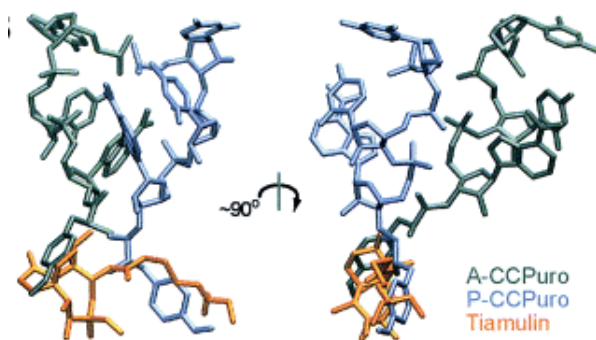


direkter Bindungspartner von A2058 ist, muss also die Wirkung von Tiamulin und Valnemulin auf diese Positionen mittelbar, d.h. durch Konformationsänderungen bedingt sein. Die C-14 Extension von Tiamulin überlagert die P-Bindungsstelle und kann den Initiationskomplex über die Bindung der fMet-tRNA an die P-Bindungsstelle destabilisieren aber dessen Bildung nicht zwangsläufig verhindern. Dies zeigt sich auch dadurch, dass die Initiator-tRNA trotz Tiamulinbindung binden kann.

Wenn sich dennoch ein Initiationskomplex ausgebildet hat, verhindert der Mutlinkern in der A-Bindungsstelle die Bindung der Aminoacyl-tRNA zur A-Bindungsstelle und somit die erste Peptidknüpfung (Abbildung 5) (Wilson, 2011).

Dies passiert wahrscheinlich, indem durch die Bindung von Tiamulin Interaktionen oder Bewegungen der Aminoacyl-Enden der tRNAs in der Nähe der Nukleotide U2506 und U2584/2585 gestört werden.

Bereits ablaufende Translationen in Ribosomen werden durch Tiamulin nicht verhindert.



**Abbildung 5:** Überlappung von Tiamulin mit den A- und P-tRNA-Enden (Schlünzen et al., 2004).

## 2.3 Resistenzen

### 2.3.1 Allgemein

Im Bereich der Bakteriologie beschreibt der Begriff Resistenz eine graduell variierende Unempfindlichkeit von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Der Grad der Unempfindlichkeit ist abhängig vom Wirkstoff und seiner Konzentration, den Bakterien und vorliegenden Resistenzmechanismen (Schwarz und Kehrenberg, 2000). Man

unterscheidet intrinsische (natürliche) und erworbene Resistenzen. Intrinsische Resistenzen sind auf das Fehlen oder die Unzugänglichkeit des Wirkortes des Antibiotikums bei den jeweiligen Bakterien zurückzuführen. Ein Beispiel für natürliche Resistenzen sind Mykoplasmen, die zellwandlos sind und somit unempfindlich gegenüber Antibiotika, die die Zellwand angreifen ( $\beta$ -Laktam-Antibiotika).

Erworbene Resistenzen können auf Mutationen in chromosomalen Genen zurückzuführen sein. Mutationen können im Rahmen von Zellteilungsvorgängen weitergegeben werden. Unter dem Selektionsdruck einer antibiotischen Behandlung können durch Mutationen erworbene Resistenzen auftreten (Kroger et al., 2002).

Eine wichtige Rolle bei der Übertragung solcher Resistenzen spielen mobile Elemente wie Plasmide oder Transposons.

Plasmide sind extrachromosomale Elemente. Ihre Größe variiert von weniger als 2 kbp bis über 100 kbp. Plasmide sind aufgrund von Replikationsgenen zur autonomen Replikation befähigt. Plasmid-kodierte Eigenschaften sind nicht essentiell, können allerdings unter bestimmten Bedingungen einen Selektionsvorteil für das Bakterium darstellen, wenn sie beispielsweise Resistenz- oder Virulenzgene tragen. Plasmide werden für gewöhnlich bei der Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt. Große Plasmide können Gene tragen, die sie zur horizontalen Übertragung zwischen verschiedenen Wirtszellen befähigen, wie den *tra*-Gen Komplex, der sie zur Konjugation befähigt. Im Gegensatz dazu besitzen Transposons keine Replikationssysteme und sind daher auf die Integration in Wirts-DNA oder Plasmide angewiesen. Transposons variieren in Größe und Struktur. Größere Transposons tragen gewöhnlich Resistenzgene. Viele Transposons besitzen keine Zielspezifität, wodurch sie sich in verschiedenen Positionen der chromosomalen- oder Plasmid-DNA einbauen können (Schwarz et al., 2005).

### **2.3.2 Minimale Hemmkonzentration (MHK)**

Die Empfindlichkeit eines Bakteriums gegenüber einem Antibiotikum wird durch die Minimale Hemmkonzentration (MHK) definiert. Die MHK ist die niedrigste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, die die Vermehrung eines Bakterienstammes unter definierten Bedingungen verhindert. Die MHK-Werte werden derzeit zur Einteilung eines Erregers in sensibel oder resistent gegenüber einem Antibiotikum genutzt.

Hierbei wird ein Erreger als sensibel eingestuft, wenn die MHK unterhalb der festgelegten Grenzkonzentration liegt, sodass bei der gebräuchlichen Dosierung, einer geeigneten pharmakologischen Verteilung, ausreichender Konstitution des Patienten und korrekter Indikation ein Behandlungserfolg zu erwarten ist. Bei resistenten Bakterien liegt entsprechend die MHK über der Grenzkonzentration, sodass auch bei Verwendung der zugelassenen Höchstmenge kein Therapieerfolg zu erwarten wäre. Eine dritte Einstufung als „intermediär“ ist für viele Antibiotika festgelegt. Fällt die MHK in den Bereich intermediär, ist der Therapieerfolg fraglich, kann jedoch unter Umständen durch eine Dosiserhöhung verbessert werden. Eine Dosiserhöhung kann bei lebensmittelliefernden Tieren eine verlängerte Wartezeit nötig machen und sie geht mit einer höheren Stoffwechselbelastung einher (Kahlmeter, 2003; Schwarz et al., 2003).

Für den klinischen Therapieerfolg sind jedoch zusätzlich zu den MHK-Werten pharmakokinetische und toxikologische Parameter, chemisch-physikalische Eigenschaften des Antibiotikums sowie klinische Kenntnisse einzubeziehen (Böttner et al., 2000). Diesen sogenannten klinischen „breakpoints“ kommt eine erhebliche Bedeutung bei der Interpretation der MHK-Werte zu; sie konnten allerdings bislang für die meisten tiermedizinisch relevanten Erreger noch nicht etabliert werden (Schwarz et al., 2003).

#### **2.3.2.1 MHK-Grenzwerte für *B. hyodysenteriae***

Grenzwerte zur Einteilung von *Brachyspira* spp. in sensibel, intermediär und resistent wurden erstmals 1990 von Rønne und Szancer festgelegt. Als Grundlage dienten die Kolongewebskonzentrationen für Tylosin, Lincomycin und Tiamulin bei Standarddosierung (Tabelle 1).

Der Grenzwert für Valnemulin wurde für Deutschland anhand der Kolongewebskonzentration nach Höchstdosierung (11,7 mg/kg KGW) festgelegt (Tabelle 1). In Dänemark wird zur Behandlung der Dysenterie eine Dosierung von 3,8 mg/kg KGW eingesetzt. Hieraus ergeben sich entsprechende Grenzwerte von  $< 0,5 \mu\text{g/ml}$  für empfindliche und  $> 2 \mu\text{g/ml}$  für resistente Stämme (Rohde, 2007).

Diese Grenzwerte basieren jedoch ausschließlich auf pharmakokinetischen Daten. Nimmt man sie als absolute Grenze an, wären die meisten bekannten *B. hyodysenteriae*-Stämme empfindlich gegenüber Tiamulin. Im Hinblick auf Monitoring-Studien, die den graduellen

Anstieg der Resistenzentwicklung untersuchen, ist die Etablierung neuer Grenzwerte bzw. „breakpoints“ (s.2.5.2.1) notwendig. Aufgrund der Segregation von *B. hyodysenteriae* Stämmen bei einer MHK von 0,5 µg/ml schlagen Karlsson et al. (2003) vor, Stämme mit einem MHK-Wert um 0,5 µg/ml als mäßig resistent zu bezeichnen.

**Tabelle 1:** MHK-Grenzwerte und Gewebekonzentrationen für verschiedene gegen Brachyspiren einsetzbare Antibiotika (zitiert nach Keßler, 2001)

	Colongewebe µg/g	Coloninhalt µg/g	MHK - Grenzwerte µg/ml		
			S	I	R
Tylosin <sup>1</sup>	1	/	≤ 1	> 1 ≤ 4	> 4
Lincomycin <sup>1</sup>	2	36	≤ 4	> 4 ≤ 36	> 36
Tiamulin <sup>1</sup>	2-4	8-13 <sup>2</sup>	≤ 1	> 1 ≤ 4	> 4
Valnemulin	0,16 <sup>3</sup>	1,68 <sup>3</sup>	< 0,5 <sup>5</sup>	/	> 2 <sup>5</sup>
	0,48 <sup>4</sup>	5,2 <sup>4</sup>	≤ 1	> 1 ≤ 5	> 5

<sup>1</sup>nach Rønne und Szancer, IPVS 1990; <sup>2</sup>nach Szancer, 2001; <sup>3</sup> Dosierung 3,8 mg/kg KGW (Dänemark); <sup>4</sup>Dosierung 11,7 mg/kg KGW ( Fa. Novartis Tiergesundheit); <sup>5</sup> Grenzwerte für Valnemulin in Dänemark

### 2.3.3 Resistenzmechanismen

Im Allgemeinen lassen sich 3 Gruppen von Resistenzmechanismen unterscheiden. Aktive Transportsysteme wie Effluxpumpen verhindern die Anreicherung eines Antibiotikums in der Zelle. Chemotherapeutika können außerdem durch enzymatische Inaktivierung ihre antimikrobiellen Eigenschaften verlieren. Eine weitere Möglichkeit liegt in der Veränderung der Struktur der Wirkorte der Antibiotika. Diese kann durch Mutationen in chromosomalen Genen aber auch durch die direkte Methylierung entscheidender Bindungspartner zu einer herabgesetzten Affinität des Antibiotikums gegenüber seinem Wirkort führen (Vester und Douthwaite, 2001).

### 2.3.3.1 Resistenzmechanismen gegen Pleuromutiline

Tiamulin-resistente Isolate von *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* werden zunehmend in verschiedenen Teilen Europas beobachtet.

Die Entwicklung zur Resistenz geschieht langsam und stufenweise in vitro (Böck et al., 1982; Drews et al., 1975; Karlsson et al., 2001). Die einzigen bisher nachgewiesenen Resistenzmechanismen bei Pleuromutilinen beruhen auf Mutationen bzw. Methylierungen des Peptidyltransferasezentrums. Es gibt Hinweise darauf, dass Mutationen in ribosomalen Proteinen mit unmittelbarer Nähe zum Peptidyltransferasezentrum einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Bakterienstämme gegenüber dort angreifenden Antibiotika haben (Long et al., 2009; Pringle et al., 2004).

#### Methylierung der 23S rRNA

Eine kürzlich beschriebene *cfr*-Methyltransferase methyliert die Position A2503 der 23S rRNA und führt so zu herabgesetzter Empfindlichkeit gegen Phenicole, Lincosamide, Oxazolidinone, Pleuromutiline und Streptogramin A-Antibiotika (PhLOPSA). Dies konnte für *E. coli* und *Staphylococcus spp.*, inklusive Methicillin resistenten *S. aureus*, gezeigt werden. Der erste Nachweis gelang mit aus Rindern bzw. Schweinen isolierten *Staphylococcus spp.* (Long et al., 2006; LaMarre et al., 2011). Es handelte sich außerdem um den ersten Nachweis eines übertragbaren Resistenzmechanismus gegen Pleuromutiline. Der Nachweis des *cfr*-Gens in deutschen Staphylokokken-Stämmen gelang bis 2006 nur selten, was die Autoren auf den selektiven Einsatz der Pleuromutiline in der Rinder- und Schweinenutztierhaltung zurückführten (Long et al., 2006). Weltweit nahmen seither Berichte über *cfr*-positive Staphylokokken-Stämme zu, wobei unklar blieb, ob dies mit der raschen Ausbreitung durch das mobile Element zustande kommt, oder das Gen bisweilen übersehen wurde. Neuere Untersuchungen konnten zudem zeigen, dass die Methylierung dieser funktionell wichtigen Position in der 23S rRNA nicht, wie angenommen, die Wachstumsrate der Staphylokokken beeinflusst und somit keinen Selektionsnachteil darstellt (LaMarre et al., 2011).

#### Mutationen der 23S rRNA

Insbesondere bei Bakterien wie *B. hyodysenteriae*, die nur 1-2 rRNA-Operons besitzen, sind Mutationen in der 23S rRNA die resistenzbestimmenden Faktoren. Über „Footprinting“-Analysen konnte gezeigt werden, dass Mutationen an Nukleotiden, die nicht direkte Bindungspartner darstellen, die Struktur der rRNA verändern, wodurch die Bindungsaffinität

der Antibiotika herabgesetzt wird. Mutationen an den Positionen G2032, C2055, G2447, C2499 und T2504 konnten in vitro mit einer herabgesetzten Empfindlichkeit gegenüber Tiamulin assoziiert werden (Tabelle 2) (Pringle et al., 2004; Long et al., 2009). Diese auf Tryptikase-Soja-Agar mit Zusatz von Tiamulin passagierten Stämme wiesen Mutationskombinationen auf, wie sie im Feld nicht zu finden waren, was die Autoren auf eine herabgesetzte Vitalität dieser Stämme oder auf eine zu hohe Tiamulinkonzentration bei langer Exposition zurückzuführen (Pringle et al., 2004). Jede Mutante zeigte ein unterschiedliches Muster an Mutationen in der 23S rRNA. Die Stämme mit den höchsten MHK-Werten hatten zwei Mutationen in der 23S rRNA und eine Mutation im ribosomalen Protein L3. Eine der Mutationen lag an Position U2504 (Tabelle 2). U2504 nimmt in der Tiamulinbindung eine zentrale Stellung ein, da es direkt in der Bindungstasche der Pleuromutiline liegt und damit einen direkten Bindungspartner darstellt. Eine G2032A Mutante bewirkte zusammen mit T2504G und einem Aminosäureaustausch in L3 ebenfalls MHK-Werte von > 128 µg/ml für Tiamulin (Tabelle 2) (Pringle et al., 2004). Die Gruppe um Hidalgo et al. (2011) konnte die G2032A Mutante in 40 % der Tiamulin-resistenten Stämme nachweisen (Tabelle 3). Die Mutante trat allerdings nie bei Tiamulin-empfindlichen Stämmen auf. Zusätzlich waren die Mutationen A2058T, G2535A, C2362T und A2031G in unterschiedlichen Mustern vorhanden (Tabelle 3) (Hidalgo et al., 2011).

Neben U2504 spielt auch A2503 der 23S rRNA eine zentrale Rolle in der Resistenzentwicklung zahlreicher Antibiotika, die am Peptidyltransferasezentrum angreifen, unter anderem Phenicole, Lincosamide, Pleuromutiline und Streptogramin A, da sie Teil der Bindungstasche im Ribosom sind. Eine A2503U Mutante führte zu Resistenzen gegenüber Tiamulin und Valnemulin in *Mycoplasma gallisepticum* (Li et al., 2010). Eine Studie versuchte die Interpretation der Relevanz der einzelnen Mutationen an *Mycobacterium smegmatis*, da dieses nur ein funktionelles rRNA Operon besitzt. Eine A2503G sowie U2504G Mutante brachte einen 4-fachen MHK-Anstieg für Chloramphenicol und Valnemulin (Andersson und Hughes., 2010; Long et al., 2009).

Karlsson et al. (1999) beschrieben eine Einstufenresistenz gegen Makrolide und Lincosamide auf Basis einer A2058T Mutante. Dieser Zusammenhang konnte anhand der Untersuchungen von Hidalgo et al. (2011) bestätigt werden, die an dieser Position noch eine zweite Mutante (A2058G) in Feldisolaten nachweisen konnten, die zuvor lediglich in vitro beobachtet worden war (Karlsson et al., 1999). Diese Mutation scheint einen Selektionsnachteil zu haben, da nur 3 von 38 Isolaten die Mutante (G) aber 35 Isolate die T-Mutante trugen. Alle G-Mutanten

waren mit den Mutationen G2057A und C2611T gekoppelt, was den Selektionsnachteil eventuell wieder ausglich (Vester und Douthwaite, 2001).

Hidalgo et al. (2011) hielten Mutationen G2087T, C2146T, G2365C, G2535A und C2362T für die Resistenzentwicklung gegenüber Pleuromutilinen aufgrund des Abstandes zur Bindungsstelle von 50-120Å für irrelevant, schlossen aber einen synergistischen Effekt mit anderen Mutationen nicht aus.

Die Methylierung des Guanin an der variablen Position 2535 (Treede et al., 2003) und die Mutation zu Adenin (Hidalgo et al., 2011) wurden beide mit einer Resistenz gegen Avilamycin in Verbindung gebracht. Allerdings scheint diese Resistenz einem hohen negativen Selektionsdruck zu unterliegen (Delsol et al., 2005).

In deutschen Stämmen konnten bislang keine Mutationen in der 23S rRNA gefunden werden, die bei der Tiamulin-Bindung eine Rolle spielen (Pringle et al., 2004).

**Tabelle 2:** Punktmutationen von Teilsequenzen der 23S rRNA (Domäne V) und dem Gen des ribosomalen L3 Proteins von *B. hyodysenteriae* und *B. pilosicoli* und die dazugehörigen MHK-Werte. Die Varianten stammen aus in vitro kultivierten und auf Tiamulin-Agar passagierten Stämmen und Feldisolaten (Pringle et al., 2004).

TIA= Tiamulin; CAM= Chloramphenicol

MHKs in µg/ml				Punktmutationen in der 23S rRNA an Positionen L3 Mutationen						
Stamm	Spezies	TIA	CAM	G2032	C2055	G2447	C2499	T2504	A2572	
K4S	B.h.	0,063	4							
K4p	B.h.	4	128					G		
K4R	B.h.	>128	128	A				G		Asn148Ser
P2S	B.h.	2-4	1							
P2R	B.h.	64	2							Ser149Ile
P4S	B.h.	0,25	2							
P4R	B.h.	8	16			T				Asn148Lys
P5S	B.h.	0,5	2							Asn148Ser
P5R	B.h.	32	8	A			A			Asn148Ser
P6S	B.h.	0,063	4							
P6R	B.h.	4	16		A				T	
K2S	B.p.	0,031	8							
K2R	B.p.	>128	256		A			G		Asn148Ser
Feldstämme										
E1	B.h.	16-32	4							Asn148Ser
E7	B.h.	0,5	2							Asn148Ser
E8	B.h.	0,063	8							

TIA= Tiamulin; VAL= Valnemulin; LINC= Lincomycin; TYLO= Tylosin; TYLV= Tylvalosin

[illegible]





### **Mutationen im ribosomalen Protein L3**

Bøsling et al. (2003) beschrieben eine Punktmutation im ribosomalen Protein L3 an Aminosäure (AS) 149 mit Aminosäureaustausch von Asparagin (Asn) zu Asparaginsäure (Asp). Der Austausch führte zu einer Tiamulin-resistenten *E. coli* Mutante.

Pringle et al. (2004) konnten an in vitro kultivierten und auf Tiamulin Agar passagierten Stämmen zeigen, dass dieser oder der Austausch der benachbarten Aminosäure 148 auch bei Stämmen von *B. pilosicoli* und *B. hyodysenteriae* mit verminderter Empfindlichkeit gegenüber Pleuromutilinen assoziiert waren. Die Autoren fanden bei insgesamt 6 Stämmen aus in vitro Kultur einen Aminosäureaustausch von Asn148Ser (Serin), Asn148Lys (Lysin) und Ser149Ile (Isoleucin) (Tabelle 2) (Pringle et al., 2004). In 2 von 3 aus dem Feld isolierten resistenten Brachyspiren-Stämmen aus Großbritannien konnte die Mutation mit dem Aminosäureaustausch von Asn148Ser bestätigt werden. In 12 Feldisolaten aus Deutschland mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Tiamulin konnte Asn148Ser allerdings nicht nachgewiesen werden (Pringle et al., 2004). Sie war jedoch über in vitro Kultivierung auf Tiamulin-Agar induzierbar. Footprint-Analysen bestätigten die verminderte Bindungsaffinität von Tiamulin an L3-mutierte Ribosomen. Da diese Mutation in einem verlängerten Arm des ribosomalen Proteins L3 liegt und damit in das Peptidyltransferasezentrum reicht, nimmt man dortige Strukturveränderungen als Erklärung für die Resistenzwirkung an. Die vielversprechenden Ansätze zur Klärung der Resistenzmechanismen von Brachyspiren wurden in einer Untersuchung von Hidalgo et al. (2011) aufgegriffen und anhand einer größeren Zahl von Feldisolaten aus Spanien näher untersucht. In 18 Isolaten von *B. hyodysenteriae*, gegenüber denen Tiamulin jeweils eine MHK von  $\leq 0,125 \mu\text{g/ml}$  aufwies, konnte dreimal ein Asn148Ser-Aminosäureaustausch festgestellt werden, allerdings trat die Variante auch in einem von 20 Isolaten mit einem MHK  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$  auf. Zudem kam an Aminosäure 149 zweimal ein Serin-Threonin-Austausch vor (Hidalgo et al., 2011).

#### **2.3.3.2 Resistenzmechanismen gegen die MLS<sub>b</sub> Gruppe**

Die Resistenzmechanismen gegen Makrolide, Lincosamide und Streptogramine, sind weitgehend geklärt. Obwohl die Wirkstoffgruppen chemisch und strukturell sehr unterschiedlich sind, teilen sie ähnliche Wirkmechanismen an der 50S Untereinheit des

Ribosoms, wodurch Kreuzresistenzen auftreten (MLS<sub>b</sub>-Resistenz) (Vester und Douthwaite, 2001).

### **Methylierung der 23S rRNA**

Bereits 1971 wurde die Methylierung an einer Position der 23S rRNA (A2058) mit reduzierter Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin in einem *Staphylococcus aureus*-Stamm in Verbindung gebracht (Lai und Weisblum, 1971). Mittlerweise ist bekannt, dass die Expression einer Methyltransferase, die auf dem *erm*-Gen kodiert ist, für diese Methylierung verantwortlich ist. Die Expression ist unter dem Einfluss von Erythromycin induzierbar (Weisblum und Demohn, 1969). Besonders bei Bakterien, die mehrere rRNA-Operons besitzen, ist die Methylierung der hauptsächliche resistenzinduzierende Faktor.

### **Mutationen in der 23S rRNA**

Da für die Resistenzentwicklung gegen die MLS<sub>b</sub>-Gruppe die Mutation einer Base in der 23S rRNA ausreicht, spricht man von einer Einstufenresistenz (Vester und Douthwaite, 2001). Für *B. hyodysenteriae* sind A2058U/G Mutanten für die höchsten MHK-Werte verantwortlich (Karlsson et al., 1999). Diese Position ist die einzige, die eine echte MLS<sub>b</sub>-Resistenz auslösen kann, d.h. die MHK-Werte aller drei Wirkstoffgruppen liegen im resistenten Bereich (Vester und Douthwaite, 2001).

Generell ist die schnelle Resistenzentwicklung durch Mutationen an A2058 für Bakterienspezies beschrieben, die, wie *B. hyodysenteriae*, 1 oder 2 rRNA-Operons besitzen (Zuerner und Stanton, 1994). Arten mit multiplen rRNA-Operons wie Streptokokken, Enterokokken und Staphylokokken entwickeln Resistenzen bevorzugt über die *erm*-Methyltransferase oder über Efflux-Pumpen (Kataja et al., 1999; Ross et al., 1990).

So ist die Methylierung der 23S rRNA an Position A2058 durch eine *erm*-Methyltransferase z.B. für *S. aureus* beschrieben (Vester und Douthwaite, 2001).

Weitere Mutationen sind für die geringere Empfindlichkeit verschiedener Bakterienspezies gegenüber Makroliden verantwortlich. Mutationen an den gepaarten Positionen 2057 und 2611 führen zur Interaktion mit der Makrolid-Bindungsstelle (Vester und Douthwaite, 2001).

Die Position A2059 ist für die Bindung von Makroliden in einigen Bakterienarten von noch größerer Bedeutung als A2058. Eine A2059G Mutation in *M. pneumoniae* bedingt

beispielsweise höhere MHK-Werte als die gleiche Mutation an Position 2058 (Lucier et al., 1995).

### **Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4 und L22**

Die ribosomalen Proteine L4 und L22 bilden einen Teil des Tunnels, durch den die verlängerte Peptidkette das Ribosom verlässt. Ihre Ausläufer reichen bis in den Kern der großen ribosomalen Einheit (50S). Mutationen, die nahe dem Peptidyltransferasezentrum liegen, konnten für eine herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin in *Streptococcus pneumoniae* verantwortlich gemacht werden (Tait-Kamradt et al., 2000; Zaman et al., 2007).

### **2.3.4 Verbreitung von Resistenzen gegen *B. hyodysenteriae***

Tylosin wurde bis Ende der 90er Jahre häufig als Wachstumsförderer in der Schweineproduktion eingesetzt (Karlsson et al., 1999). Als Therapeutikum wird es bis heute genutzt. *Brachyspira* spp. weisen heute hohe Resistenzraten gegen Tylosin und Kreuzresistenzen gegen Lincomycin auf (Binek und Szynekiewicz, 1984; Hommez et al., 1998; Karlsson et al. 2002, 2003). Aus einigen Ländern wie Großbritannien, der Tschechischen Republik, Schweden und Deutschland liegen *B. hyodysenteriae* Isolate mit verringerter Empfindlichkeit gegenüber Tiamulin vor (Karlsson et al., 2003; Lobová et al., 2004; Rohde et al., 2004).

Von 57 schwedischen *B. hyodysenteriae*-Isolaten, die zwischen 1996 und 1999 gesammelt wurden, waren zwei Drittel gegenüber Tylosin (MHK > 256 µg/ml) resistent. Gleichzeitig bestanden Kreuzresistenzen gegen Erythromycin und Clindamycin (Karlsson et al., 2003).

94 % tschechischer Stämmen zeigten eine MHK zwischen 64 und 256 µg/ml für Tylosin und 89 % waren empfindlich gegen Tiamulin (0,016-0,25 mg/ml) und Valnemulin (0,016-0,064 µg/ml) (Novotná und Skardová, 2002).

Auch der Vergleich tschechischer Stämmen aus 1997-1998 mit Stämmen aus 1999-2001 ergab einen signifikanten Anstieg der MHK-Werte von *B. hyodysenteriae* gegen Pleuromutiline. Die MHK-Werte stiegen für Tiamulin von 0,25 µg/ml auf 4 µg/ml, für Valnemulin von < 0,031 auf 8 µg/ml. Für diesen Anstieg machen die Autoren den Beginn des

intensiven Einsatzes der Pleuromutiline in der Behandlung und Eradikation der Dysenterie verantwortlich (Lobová et al., 2004).

In einer spanischen Studie wurden 108 *B. hyodysenteriae* Feldisolate von durchfallerkranken Schweinen zwischen 2000 und 2007 getestet. Die MHK für Tylosin lag bei 83,3 % der Stämme über 256 µg/ml. Durch die Kreuzresistenz mit Erythromycin ergab sich für diesen Wirkstoff ein vergleichbares Bild. Die MHKs für Tiamulin zeigten eine bimodale Verteilung mit einer Spitze bei 0,125 µg/ml (18,5 %) und einer bei > 2 µg/ml (17,6 %). Etwa 1/3 der Isolate zeigten eine MHK von < 0,016 µg/ml für Valnemulin und 1/3 zwischen 0,125-0,5 µg/ml (Hidalgo et al., 2009). Eine Folgestudie aus 2008 und 2009 ergab einen 4-fachen Anstieg der MHK-Werte für Tiamulin und Valnemulin. Acetylisovaleryltylosin (Aivlosin) zeigte eine etwas günstigere Wirksamkeit: Die MHK aller Stämme betrug mindestens 0,5 µg/ml; ca. 25% der Stämme waren resistent (Hidalgo et al., 2010). Die Resistenzsituation für Tylosin blieb vergleichbar.

In einer Studie aus Belgien wurde zwischen 2006 und 2009 für *B. hyodysenteriae*-Stämme ein Anstieg der MHK-Werte für Tiamulin von 2 µg/ml auf über 8 µg/ml und für Valnemulin von 0,5 µg/ml auf 8 µg/ml nachgewiesen (Vangroenweghe et al., 2010).

Umfangreiche Daten aus Deutschland für den Zeitraum von 1989-2001 zeigten einen Anstieg der MHK von 1 µg/ml auf 8 µg/ml für Tiamulin und von 0,5 µg/ml auf 8 µg/ml für Valnemulin im Agardilutionstest (ADT) (Rohde et al., 2004).

Untersuchungsergebnisse aus den Jahren 2002-2005, die mittels ADT QuickMIC® erzeugt wurden, zeigten einen dramatischen Anstieg der MHK-Werte. Im Jahre 2005 hatten 100 % der *B. hyodysenteriae*-Stämme von durchfallerkranken Tiere einen MHK-Wert > 4µg/ml gegen Tylosin und 98,1 % einen MHK-Wert > 36 µg/ml gegenüber Lincomycin. Der Anteil Stämme mit MHK-Werten > 4 µg/ml stieg von 2002 bis 2005 für Tiamulin von 43,8 % auf 45,5 %. Im gleichen Zeitraum sank die Anzahl der Stämme mit einem MHK-Wert > 4 µg/ml gegen Valnemulin von 30,3 % auf 27,9 % (Rhode, 2007).

Eine weitere Studie aus Deutschland, durchgeführt mit dem Agardilutionstest zwischen 2003 und 2005 zeigte insgesamt Resistenzraten von 97,8 %, 65 %, 4,4 % und 0 % für Tylosin, Lincomycin, Tiamulin und Valnemulin (Schlez, 2011).

Eine zweite Studie aus den Jahren 2005 bis 2006, durchgeführt mittels Mikroboulliondilutiostest (MBDT) ergab eine mittlere MHK von 2 µg/ml für Tiamulin. Bei annähernd 80 % der Stämme wurden MHK-Werte ≤1 µg/ml ermittelt. 18,8 % hatten Werte > 1 und ≤ 4 µg/ml und 2,1 % zeigten MHK-Werte > 4µg/ml (Ritzmann et al., 2009).

#### 2.3.4.1 Der Gene-Transfer-Agent VSH-1

Der erste Nachweis eines Bakteriophagen von *B. hyodysenteriae* gelang aus dem Referenzstamm B204. Der Name VSH-1 steht für „Virus von *Serpulina dysenteriae*“ (Humphrey et al., 1997). VSH-1 ähnliche Elemente sind unter *Brachyspira* spp. weit verbreitet, auch unter Stämmen, die aus dem menschlichen Gastro-Intestinaltrakt isoliert wurden. Wahrscheinlich haben sie zur Entstehung der hohen Variabilität von *B. hyodysenteriae* maßgeblich beigetragen. VSH-1 ist der erste beschriebene, natürliche Gentransfer-Mechanismus in Spirochäten (Humphrey et al., 1997; Matson et al., 2005).

VSH-1 kann etwa 7,5 kb große Genfragmente zwischen *B. hyodysenteriae*-Stämmen mittels Transduktion übertragen. Weitere Untersuchungen konnten 11 Proteine identifizieren, die in Kopf- und Schwanzproteine unterteilt sind. VSH-1 kann durch Mitomycin C, Carbadox, Metronidazol und Wasserstoffperoxid in subtherapeutischen Dosen induziert werden. Die durch diese Wirkstoffgruppen ausgelösten Mutationen an der DNA scheinen zu einer Art „SOS-Signal“ zu führen, das die Induktion des Bakteriophagen auslöst. VSH-1 Elemente, die durch diese Antibiotika induziert wurden, übertrugen bei Co-Kultur empfindlicher und resistenter Stämme innerhalb von 24 Stunden Chloramphenicol- und Tylosinresistenz zwischen *B. hyodysenteriae* Stämmen (Stanton et al., 2009).

Neun weitere Antibiotika, darunter Tylosin und Tiamulin, konnten keine Induktion von VSH-1 bewirken (Stanton et al., 2009).

Mittlerweile konnten VSH-1 ähnliche Gene Transfer Agents (GTAs) auch in *B. pilosicoli* und *B. intermedia* nachgewiesen werden. Weitere Arbeiten müssen klären, in welchem Ausmaß die GTAs Wirtsgene zwischen verschiedenen Spezies und Stämmen übertragen können (Motro et al., 2009).

#### 2.3.5 Methoden zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit

Verschiedene Systeme zum Nachweis der in vitro Empfindlichkeit eines Erregers gegenüber ausgewählten Antibiotika wurden beschrieben. Sie unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie in den jeweils erreichten Werten (Rocksins, 2005; Schwarz et al., 2003; Schwarz et al., 2005).

Die konventionellen Methoden erlauben quantitative bis semiquantitative Aussagen über die Empfindlichkeit eines Isolates, sind jedoch für Aussagen über die zugrunde liegenden Resistenzmechanismen ungeeignet. Molekularbiologische Methoden wie die PCR, DNA-Sequenzierung und Microarray-Systeme stehen für die Anwendung in der Praxis bislang noch kaum zur Verfügung (Guerra et al., 2003; Palka-Santini et al., 2009).

#### **2.3.5.1 Agardiffusionstest**

Beim Agardiffusionstest wird zunächst ein Inokulum einer definierten Bakteriendichte auf einem Agar ausgestrichen. Anschließend wird der Agar mit einem Testplättchen mit definierter Wirkstoffmenge beschickt. Der Wirkstoff diffundiert aus dem Testplättchen in den Agar hinein. Somit wird im Agar ein Wirkstoffgradient erzeugt, der im positiven Fall das Wachstum der zu testenden Bakterien in der Umgebung des Plättchens hemmt. Diese Zone wird als Hemmhof bezeichnet. Aufgrund der Größe des Hemmhofes (in mm) wird der Keim qualitativ als sensibel, intermediär oder resistent eingeteilt (Schwarz et al., 2003). Eine quantitative Aussage über die Empfindlichkeit des Erregers ist nicht möglich.

Der Agardiffusionstest hat den Vorteil, dass er schnell, kostengünstig und mit geringem Aufwand durchzuführen ist (Altreuther et al., 1997; Kolbert und Shah, 2002).

Ein Nachteil ist, dass schon bei geringen Abweichungen von den Durchführungsvorschriften stark divergierende Ergebnisse beobachtet werden (Altreuther et al., 1997).

Aufgrund der Fehleranfälligkeit des Tests in Verbindung mit dem langsamen Wachstum der Brachyspiren sollte auf andere Testmethoden zurückgegriffen werden.

#### **2.3.5.2 E (Epsilon)-Test**

Der E-Test ähnelt prinzipiell dem Agardiffusionstest. Hier wird jedoch anstelle eines Testplättchens ein Teststreifen mit einer graduell zunehmenden Antibiotikakonzentration im Streifen auf den Agar aufgebracht. Eine Skala auf dem Teststreifen gibt die Antibiotikakonzentration an der jeweiligen Stelle an. Anhand des Bakterienwachstums wird eine minimale Hemmkonzentration abgelesen (Altreuther et al., 1997). Der E-Test gilt als robustes

Verfahren, mit dem auch langsam wachsende Erreger und Anaerobier zuverlässig getestet werden können. Zudem ist das Testsystem weniger fehleranfällig und lässt sich gut reproduzieren.

Nachteilig sind die hohen Kosten für die Teststreifen und das Fehlen kommerziell erhältlicher Teststreifen mit Chemotherapeutika, die in der Veterinärmedizin eingesetzt werden, weshalb auch dieser Test nicht für Brachyspiren verwendet wird.

### 2.3.5.3 Dilutionstest

Der Mikroboulliondilutionstest für Brachyspiren wurde von Karlsson et al. entwickelt (2002, 2003). Seither wurden in verschiedenen Studien die üblicherweise verwendeten Agardilutionstests und Boulliondilutionstests verglichen (Rohde et al., 2004).

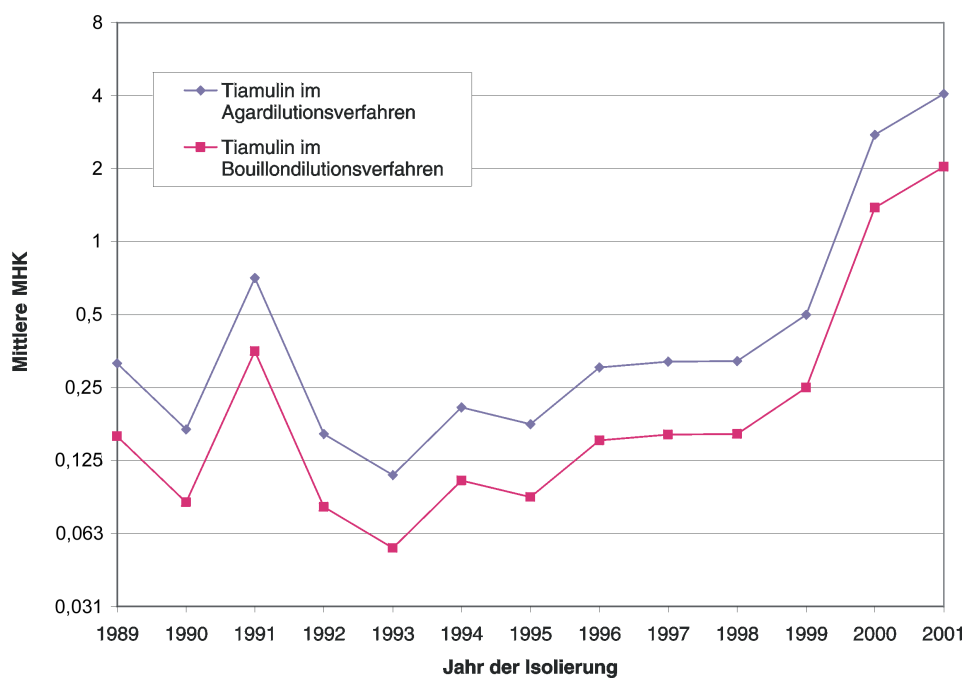
Dilutionstests oder auch Reihenverdünnungstests können unter Verwendung flüssiger Medien in Röhrchen (Makroboullion), Mikrotiterplatten (Mikroboullion) oder festen Medien (Agardilution) durchgeführt werden. Eine definierte Menge von Bakterien wird den unterschiedlichen Konzentrationen des zu testenden Wirkstoffes zugesetzt und inkubiert. Bei der Auswertung gilt als MHK die geringste Verdünnungsstufe, bei der makroskopisch kein Wachstum der Bakterien mehr sichtbar ist. Somit wird ein quantitatives Ergebnis erzeugt, das einen guten Vergleich mit der benötigten Wirkstoffkonzentration im Zielgewebe zulässt. Für Mikrodilutionsverfahren gibt es bereits kommerziell erhältliche Kits (Schwarz et al., 2003).

Ein Nachteil der Dilutionsverfahren ist die Gefahr von Kontaminationen. Möglich ist auch, dass die zu testenden Bakterien während des Testverfahrens absterben. Das Mitführen einer Wachstumskontrolle und eines Kontrollstammes ist unerlässlich. Außerdem müssen die Konzentrationsbereiche der Antibiotika so gewählt werden, dass der Übergang von Wachstum zu Hemmung der Bakterien erkennbar ist (Kolbert und Shah, 2002).

Problematisch sind die testabhängig abweichenden Ergebnisse. In einer Vergleichsstudie zwischen dem Agar- und Boulliondilutionstest fanden Rohde et al. (2004) von 221 getesteten *B. hyodysenteriae* Isolaten 26,7 % resistente Stämme mittels Agardilution, aber nur 6,8 % mittels Boulliondilution. Im Durchschnitt lagen die MHKs beim Boulliontest eine Verdünnungsstufe unter der des Agardilutionstests (Abbildung 7). Hieraus ergeben sich erhebliche Konsequenzen für die Interpretation der Ergebnisse (Rohde et al., 2004). Die Autoren schlagen vor, verschiedene Grenzwerte für die Klassifizierung von Stämmen für die



unterschiedlichen Testsysteme zu etablieren. Die Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz der deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft erarbeitet derzeit ein Konzept zur Harmonisierung und Standardisierung der Methodik für die Empfindlichkeitsprüfung. Hierfür soll die Leitlinie des amerikanischen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) etabliert werden. Die Methode der Wahl ist demnach der Mikrobouillondilutionstest. Weitere Ziele sind die Erarbeitung von Grenzwerten anhand von vorhandenem Datenmaterial (DIN; CLSI; relevante Publikationen). Die aktuell verwendeten Grenzwerte bei *Brachyspiren* sind in Tabelle 1 aufgeführt.



**Abbildung 7:** Vergleich der mittleren Minimalen Hemmkonzentrationen für Tiamulin im Agar- bzw. Bouillondilutionsverfahren; *Brachyspira hyodysenteriae* (n=221) (Kessler, 2001).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Verbrauchsmaterialien und Puffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien und Puffer sind im Anhang aufgeführt.

#### 3.1.2 Bakterienstämme

64 Stämme von *B. hyodysenteriae* wurden in dieser Studie untersucht. Die Isolate stammen aus den Jahren 1990 bis 2011. 40 Stämme vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU Gießen (IHIT), 24 Isolate vom Institut für Mikrobiologie der Stiftung Tierärztliche Hochschule (TiHo), Hannover wurden in dieser Arbeit einbezogen (Tabellen 4 und 5). Die Speziesdifferenzierung wurde jeweils in vorherigen Arbeiten entweder mittels biochemischer Differenzierung oder speziesspezifischer PCR vorgenommen. Für die Stämme aus Hannover liegen lediglich die MHK-Werte für Tiamulin und Valnemulin vor, die mittels MBDT ermittelt wurden. Für die Isolate aus dem IHIT wurden neben den MHK-Werten für Tiamulin und Valnemulin auch die MHK-Werte für Tylosin und Lincomycin mittels MBDT ermittelt. Aktuelle Isolate wurden aus Kottupferproben aus einem Mastbetrieb mit hochgradiger Diarrhoe und Dysenterieverdacht im Rahmen der vorliegenden Arbeit isoliert und nach Identifikation als *B. hyodysenteriae* in die Untersuchung einbezogen. Betroffene Tiere wurden vor Beginn einer parenteralen Tiamulintherapie rektal mit Amies-Tupfern beprobt. Die Tiere wurden individuell gekennzeichnet und 10 Tage nach Beendigung der Therapie erneut beprobt. Dadurch sollte der Einfluss einer Therapie mit Tiamulin auf die MHK-Entwicklung von Bakterienpopulationen an einem Betrieb in vivo nachvollzogen werden.

**Tabelle 4:** *B. hyodysenteriae*-Isolate aus dem IHIT (Gießen) (n=40)

Tgb-Nr. IHIT	Stamm- Bezeich- nung	Jahr	MHK (µg/ml) Tylosin (MBDT)	MHK(µg/ml) Lincomycin (MBDT)	MHK(µg/ml)T iamulin (MBDT)	MHK (µg/ml) Valnemulin (MBDT)	V-Vor N-Nach Tiamulin Therapie
V2456/09	181	2009	128	8	2	2	V
V2457/09	182	2009	128	8	2	1	V
V2458/09	183	2009	128	16	4	2	V
V2459/09	184	2009	128	8	4	2	V
V2640/09	201	2009	128	32	16	4	N
V2641/09	202	2009	128	16	16	4	N
V2642/09	203	2009	128	64	16	4	N
V2643/09	204	2009	128	32	16	4	N
V2644/09	205	2009	128	32	16	4	N
V2750/09	207	2009			16	4	N
P6631/03-2	48	2003	250	16	0,0195	0,0008	
V0379/04	61	2004	500	8	0,0195	0,0031	
V1009/05	43	2005	1000	8	0,078	0,0031	
V0621/05	57	2005	250	8	0,078	0,0008	
V0615/05	76	2005	1000	16	0,078	0,0031	
V2953/04	101	2004	1000	32	0,078	0,0031	
V2787/04	50	2004	500	16	0,625	0,1	
P2677/04	32	2004	3,9	0,125	0,0098	0,0001	
V2857/05	17	2005	312	20	0,0243	0,0005	
V1840/04	15	2004	0,975	0,5	0,156	0,025	
V1685/04	24	2004	2000	16	0,156	0,1	
V0779/05	36	2004	500	64	0,025	0,1	
P2677/04	2	2004	1000	32	0,039	0,0031	
V1007/04	49	2004	500	16	0,039	0,0063	
V1008/04	51	2004	250	16	0,039	0,0031	
V1843/04	30	2004	1000	2	0,039	0,0031	
V1006/04	110	2004	250	8	0,039	0,0008	
V0482/04	42	2004	250	8	0,039	0,0016	
V2819/04-2	16	2004	4,88	1	0,002	0,048	
V2380/04	46	2004	500	0,16	1,25	0,1	
V0229/05	38	2005	250	16	1,25	0,1	
V2641/04	22	2004	1000	16	2,5	0,1	
V2483	V2483	2010	128	8	0,25	0,008	V
V2458	V2485	2010	128	16	0,25	0,004	V
V2857	V2857	2010	128	16	16	4	N
V2855	V2855	2010	128	32	16	4	N
V1415/11	V1415	2011	128	8	4	4	
V1412/11	V1412	2011	128	16	8	4	
V1413/11	V1413	2011	128	8	8	4	
V1414/11	V1414	2011	128	16	8	4	

**Tabelle 5:** *B. hyodysenteriae*-Isolate aus dem Institut für Mikrobiologie, TiHo (Hannover) (n=24)

Tgb-Nr. im IHIT	Stamm- Bezeichnung	Jahr	MHK (µg/ml) Tiamulin (MBDT)	MHK (µg/ml) Valnemulin (MBDT)
V3135	A91638/01	2001	4	2
V3136	A489-9x/01	2001	4	0,125
V3137	84998/3x/99	1999	1	1
V3138	84253-1x/99	1999	8	2
V3139	90700-2x/00	2000	8	1
V3140	90700-3x/00	2000	8	4
V3141	90583/00	2000	2	4
V3142	A2366/97	1997	0,125	0,063
V3143	A2446/94	1994	0,063	0,063
V3144	A5530/94	1994	0,063	0,063
V3145	A4295/92	1992	0,125	0,063
V3146	A0461/91	1991	0,063	0,063
V3148	A0044/90	1990	0,063	0,063
V3149	A6000/90	1990	0,063	0,063
V3150	6916-2x/10	2010	16	5
V3151	6837-1x/10	2010	0,9	1
V2113	A89565-1x/00	2000	4	2
V2114	A90534-8x/00	2000	2	4
V2115	A3011/98	1998	4	4
V2116	2230-4x/02	2002	8	2
V2117	4257-1x/02	2002	8	2
V2118	4610-4x/02	2002	8	2
V2119	4610-6x/02	2002	8	4
V2120	5019-2x/02	2002	8	2

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Anzucht und Kultivierung der Brachyspiren

Aktuelle Isolate aus dem IHIT, Gießen (Tabelle 4) wurden im Rahmen von Bestandsuntersuchungen von Mastschweinen mit Diarrhoe rektal entnommen. Die Tupfer in Transportmedium (Amies Transportmedium) wurden am Tag der Entnahme auf festen Selektivnährmedien (TSA<sup>CVSSR</sup>; s. Anhang) ausgestrichen. Die aus Hannover und Gießen zur Verfügung gestellten Stämme, die bei -80°C asserviert waren, wurden nach Auftauen bei

Zimmertemperatur mit einer Impföse auf den gleichen Platten ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten für 5-10 Tage unter anaeroben Bedingungen in einem Anaerobiertopf (Anaerocult, Fa. Merck, Darmstadt) unter Zusatz eines Anaerobiersticks (Anaerotest, Fa. Merck, Darmstadt) sowie Anaerobierpäckchen (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) bei 37 °C bebrütet. Platten mit vollständiger Hämolyse wurden makroskopisch und mikroskopisch auf das Vorhandensein von Spirochäten untersucht. Verdächtige Kolonien zeigten ein schwärmendes, an den Randbereichen unregelmäßig abgrenzbares Wachstum. Solche „Kolonien“ wurden mit einer Impföse abgehoben, erneut auf dem Selektivagar mittels Verdünnungsausstrich passagiert und anschließend für 5-10 Tage anaerob bebrütet. Diese Verfahrensweise wurde so lange wiederholt, bis makroskopisch und mikroskopisch keine Fremdkolonien mehr zu erkennen waren. Vor der Resistenztestung wurden die Kolonien erneut mittels Dunkelfeld- bzw. Phasenmikroskopie (DM RB, Leica, Darmstadt) auf das Vorhandensein spiralförmiger, beweglicher Spirochäten und die Abwesenheit anderer Kolonien hin überprüft.

### 3.2.2 Mikrobouillondilutionstest (MBDT)

Der MBDT wurde zur Empfindlichkeitsprüfung der Bakterienstämme in Anlehnung an Karlsson et al. (2002, 2003) durchgeführt. Getestet wurden Tylosintartrat (Sigma Aldrich, Schnelldorf), Lincomycinhydrochlorid (MP Biomedicals, Eschwege), Tiamulinhydrogenfumarat (Sandoz GmbH, Kundl, Österreich) und Valnemulinhydrochlorid (Sandoz GmbH, Kundl, Österreich).

Die Antibiotika wurden in Aqua dest. gelöst und eine Stammlösung sowie eine Gebrauchslösung nach der folgenden Tabelle hergestellt:

**Tabelle 6:** Stammlösungen, Gebrauchslösungen und Endkonzentrationen der Antibiotika im MBDT.

Antibiotikum	Konzentration mg/ml	1:20 Verdünnung mit BHIF µg/ml	Endkonzentration im Test µg/ml
Tylosin	5,12	256	128
Lincomycin	2,56	128	64
Tiamulin	0,64	32	16
Valnemulin	0,16	8	4

Jeder Testansatz wurde in einer steril verpackten 96-well Platte (F-Form, Fa. TPP, Schweiz) durchgeführt. Während der gesamten Testung wurde unter einer sterilen Werkbank gearbeitet. Zunächst wurde außer in der 1. Reihe in alle Vertiefungen 100 µl BHIF (Brain Heart Infusion Lösung [s. Anhang] mit einem Anteil von 20 % Fetalem Kälberserum (FKS, Fa. PAA Laboratories, Pasching, Österreich) vorgelegt. In Reihe 1 wurden dann je 200 µl Antibiotikagebrauchslösungen pipettiert. Jedes Antibiotikum wurde in einem Doppelansatz getestet. Anschließend wurden die Antibiotikagebrauchslösungen in log 2 Schritten bis zur Reihe 11 der Platte verdünnt. Die Reihe 12 diente als Wachstumskontrolle und blieb somit ohne Zusatz von Antibiotika (Abbildung 8). Als nächstes wurden die zu testenden Brachyspiren zugefügt. Hierfür wurde mit einer Einmal-Öse mit der Vorder- und Rückseite über die mit Brachyspiren bewachsene TSA-Platte gestrichen und die Bakterienkolonien in 12 ml BHIF Lösung suspendiert. Dieser Vorgang wurde noch zwei Mal wiederholt (3-Ösentechnik nach Karlsson (2003)). Anschließend wurde das Gemisch mittels Vortex gründlich durchmischt.

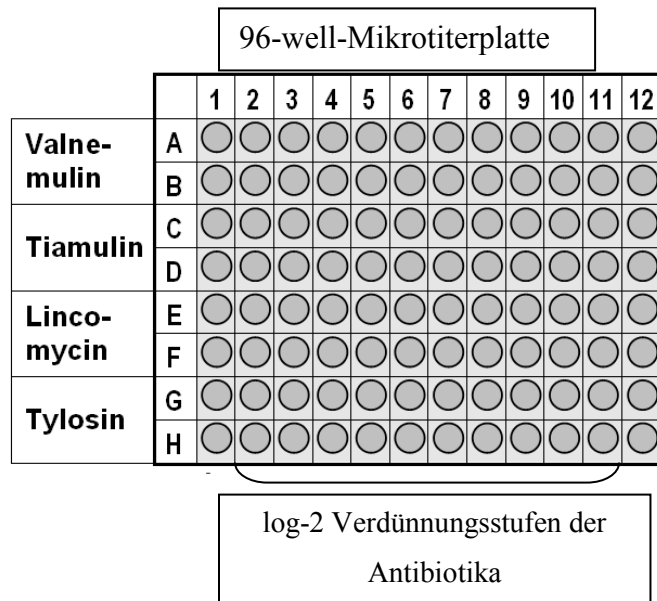
Schließlich wurden 100 µl dieser Suspension mittels Multistepper in die wells der 96-well Platte pipettiert.

Die 96-well Platten wurden abschließend mit einem Deckel verschlossen und für 5 Tage bei 37 °C in einem Anaerobiertopf (Anaerocult, Fa. Merck, Darmstadt) unter Zusatz eines Anaerobiersticks (Anaerotest, Fa. Merck, Darmstadt) sowie Anaerobierpäckchen (Anaerogen, Oxoid, Hampshire, England) auf einem Schüttelinkubator unter leicht kreisenden Bewegungen inkubiert. Nach 5 Tagen wurde das Ergebnis der Testansätze auf einem Leuchttisch beurteilt. Bei Bakterienwachstum war eine deutliche Trübung des Inokulats zu erkennen. Bei Ausbleiben des Wachstums war weiterhin eine klare, durchsichtige Flüssigkeit zu sehen.

Als MHK wurde die niedrigste Verdünnungsstufe angenommen, bis zu der in beiden Ansätzen makroskopisch kein Bakterienwachstum sichtbar war.

Zur Kontrolle wurde der Referenzstamm B204 mitgeführt. Über diesen Stamm liegen publizierte Daten für die Empfindlichkeit gegen die geprüften Antibiotika vor (Karlsson et al., 2003).

Zum Abschluss wurden die noch auf der TSA-Platte befindlichen Bakterienkolonien mittels BHIF abgeschwemmt und bei -20°C in 2 ml Eppendorf Cups für die molekularbiologische Untersuchung eingefroren.



**Abbildung 8:** Testansatz des MBDT (Reihe 1: Gebrauchslösung der Antibiotika, Reihe 2-11: log<sub>2</sub> Verdünnungsstufen, Reihe 12: Wachstumskontrolle) (nach Schlez, 2011).

### 3.2.3 Einordnung der Befunde

#### MHK-Grenzwerte

Für die Einteilung der Stämme in sensibel, intermediär und resistent wurden die international gebräuchlichen MHK-Grenzwerte nach Rønne und Szancer (1990) für Tylosin, Lincomycin und Tiamulin, bzw. der MHK-Grenzwert der Fa. Novartis Tiergesundheit für Valnemulin verwendet (Tabelle 1). In Anlehnung an Karlsson et al. (2003) wurden zur Untersuchung der Resistenzmechanismen eigene MHK-Grenzwerte, entsprechend der Verteilung der untersuchten Stämme, festgelegt. Als Grenzwert zur Unterscheidung mäßig resistenter und sensibler Stämme wurde ein Grenzwert von 0,625 µg/ml ermittelt.

### 3.2.4 Amplifikation spezifischer Sequenzabschnitte mittels PCR

#### 3.2.4.1 Konventionelle PCR

Sequenzabschnitte der 23S rRNA, L3; L4, L2 und L22 wurden von allen 64 in dieser Arbeit verwendeten *Brachyspira hyodysenteriae*-Stämmen (Tabelle 4+5) mittels PCR amplifiziert. Die jeweiligen Primerpaare wurden anhand der bekannten Gensequenzen (Gen®Bank Accession No. NC\_012225.1) kreiert (Tabelle 7).

Für die Untersuchung der Domäne V der 23S rRNA wurden bereits publizierte Primer verwendet (Pringle et al., 2004) (Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Verwendete Primer

Literatur/ Primerbezeichnung	Zielgen (Amplifikatgröße in bp)	Primersequenz	Anealing-Temperatur
Pringle et al.(2004) Karlsson et al.(1999) (2058 F0 Forward / Spiro 2 reverse) B. hyo23S F / B. hyo 23S R	23S rRNA ( 910)	F: 5'-GAG AGG TTA GCG TAA GCG AAG C-3' R: 5'-GCT TCC CAC TTA GAT GCT TTC AG-3'	51,5°C
eigene Entwicklung L3 F / L3 R	L3 (750)	F: 5'-TAT AGA GGA TTC GCC GAT GGT AG-3' R: 5'-TCT CTA AAT TGC CTA CGC TAT CTC C-3'	52,6°C
Eigene Entwicklung L3 F / L23 R	L4 (1460)	F: 5'-TAT AGA GGA TTC GCC GAT GGT AG-3' R: 5'-ATA TTT TCT CAA CCG CTT TC-3'	49,9°C
Eigene Entwicklung L23 F / L22 R	L2 + L22 (1770)	F: 5'-AAC TGA GCC TAG AGG AAC AG-3' R: 5'-CTG CTT TAG GTG CTT CTT C-3'	50,1°C

#### 3.2.4.2 Primerdesign

Die Entwicklung neuer Primer erfolgte auf Basis der Sequenzdaten aus der NCBI Nukleotid-Datenbank Gen®Bank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Mithilfe der Software OLIGO 4.0 (Primer Analysis Software, Copyright 1989-1991 by Wojciech Rychlik) wurden die Primer hinsichtlich Dimer- und Schleifenbildung, Annealingtemperatur sowie Amplifikatgröße optimiert.



Die designten Primer wurden von den Firmen Biomers (Ulm) und Sigma-Aldrich® (Schnelldorf) synthetisiert. Vor dem Einsatz wurden sie unter Zugabe von 1 x TE-Puffer (s. Anhang) auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt.

Aus den einzelnen Primern wurde anschließend eine Primermix-Stammlösung mit einer Konzentration von 20 μM hergestellt. Durch Verdünnung mittels RNase freiem Wasser um den Faktor 5 wurde eine 4 μM PCR-Gebrauchslösung angefertigt.

Die PCR wurde nach dem in Tabelle 8 aufgeführten Pipettierprotokoll durchgeführt.

**Tabelle 8:** Pipettierprotokoll für die PCR (30 μl Ansatz).

Reagenzien	eingesetzte Menge (μl)
2x Multiplex PCR Mastermix (Quiagen, Hilden)	15
Primermix-Gebrauchslösung (4μM)	3
RNase freies Wasser	9
Probe	3
Volumen pro PCR-Cup	30

In dem Thermocycler TPersonal 48 der Firma Biometra GmbH, Göttingen wurde die PCR nach folgendem Programm durchgeführt:

**Tabelle 9:** Thermocyclerprogramm

Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl
Denaturierung	95°C	15 min	1x
Amplifikation			
1	95°C	30 sek	35x
2	Annealing Temperatur s. Tab 7	1,5 min	35x
3	72°C	2 min	35x
Extension	72°C	10 min	1x
Abkühlung	4°C	∞	∞

### 3.2.5 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde auf einer Terasaki-Platte 1 µl Auftragspuffer (Loading Dye) vorgelegt. Hierzu wurden 4 µl Probe pipettiert und durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen des Gemischs mit der Pipette vermengt.

Die PCR Produkte wurden anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1,5 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromidzusatz (0,4 µg/ml) hergestellt. Die Geltaschen wurden mit je 4 µl PCR-Amplifikat befüllt. Als Längenstandard diente eine 100 bp Leiter (Appllichem, Darmstadt). Die Elektrophoreseläufe erfolgten in 1x TAE-Laufpuffer bei 120 V für 20 min.

Anschließend wurden die Amplifikate in einer Geldokumentationskammer (Bio Doc Analyze, Whatman Biometra, Göttingen) bei 365 nm dokumentiert (Canon G2 Power-Shot, Canon Inc., Tokio, Japan).

### 3.2.6 DNA-Sequenzierung und Auswertung der Nukleinsäuresequenzen

Je 26 µl PCR-Produkt der positiven Proben wurden mit 4,5 µl Emzymmix (Alkalische Phosphatase [Fast AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas, St. Leon-Rot] und Exonuclease I [ExoI, Fermentas, St. Leon-Rot] in einem Verhältnis von 2:1). Anschließend wurde die Probe erneut im Thermocycler 30 min. bei 37°C und anschließend 15 min. bei 80°C inkubiert. Durch den Enzymmix wurden die Primerreste und Nukleotide im PCR-Amplifikat verdaut.

Anschließend wurden 30 µl der gereinigten Probe mit der entsprechenden 10 µM Primer-Gebrauchslösung zur Sequenzierung an die Firma GATC-Biotech weitergeleitet.

#### 3.2.6.1 Die internationale Nukleinsäuredatenbank Gen®Bank

Zunächst wurden die Sequenzen anhand der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und dem daran angeschlossenen Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) mit allen in der Datenbank verfügbaren Sequenzen von *Brachyspira spp.* abgeglichen.

### **3.2.6.2 A plasmid Editor (ApE)**

Das Programm ApE (M. Wayne Davis) bietet neben vielen anderen Tools die Möglichkeit, die Ursprungssequenz zu begutachten und lange Amplifikate, die mit einem Vorwärts- und einem Rückwärtsprimer sequenziert wurden, zu einer Sequenz zusammenzufügen. Außerdem wird bei der Betrachtung der Sequenz klar, ob es sich um die Sequenz nur eines Stammes oder um eine mit anderen Stämmen verunreinigte Sequenz handelt.

Nicht eindeutig erkannte Nucleotide werden mit dem Buchstaben „N“ dargestellt. Durch manuelles Nachbearbeiten mit ApE wurden diese Lücken geschlossen.

### **3.2.6.3 ClustalX 2.0**

Mit ClustalX 2.0 (M. A.Larkin) wurden die Sequenzen verschiedener Stämme miteinander abgeglichen, um Polymorphismen, Insertionen und Deletionen nachzuweisen.

### **3.2.6.4 BioEdit**

BioEdit (Tom Hall, Ibis Biosciences) besitzt im Vergleich zu ClustalX 2.0 umfangreichere Tools zur Nachbearbeitung von Alignments. BioEdit wurde eingesetzt, um die korrekte Position der SNPs im Gen bzw. in der Aminosäuresequenz zu ermitteln.

### **3.2.6.5 Nomenklatur der Mutationen**

Die Nomenklatur der Mutationen erfolgte in Anlehnung an Pringle et al. (2004) und Hidalgo et al. (2011). Demnach wurden die variablen Positionen als Zahl ausgedrückt (z.B. 2535 der 23S rRNA). Entsprach die vorkommende Variable der des Referenzstammes, wurde die Position mit einer vorangestellten Base bezeichnet (z.B. G2535). Wenn die vorhandene Base

---

eine Mutante des Referenzstammes war, wurde der Position die Base des Referenzstammes vorangestellt und die Mutante angehängt (z.B. G2535A).

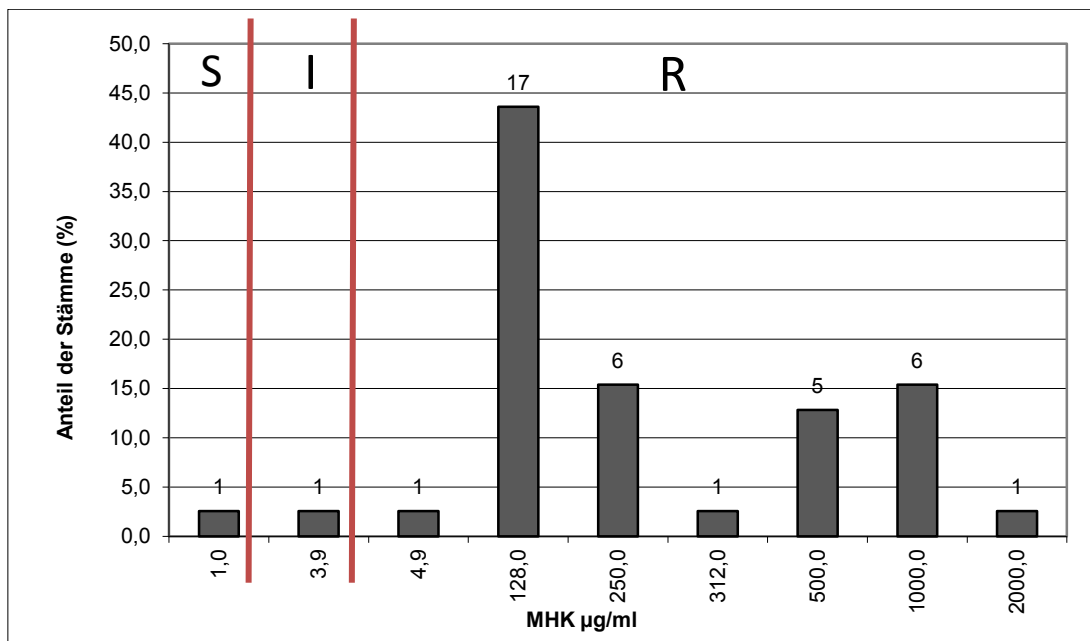
### **3.2.7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit IBM-SPSS Version 20 (IBM, München). Eine allgemeine Betrachtung der Daten erfolgte mit der Prozedur „Descriptives“. Häufigkeiten von Genvarianten wurden mit Kreuztabellen dargestellt und verglichen. Die Effekte der einzelnen Genvarianten wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse („Oneway“) berechnet. Da bei den meisten Stämmen keine weiteren Angaben zur Herkunft, zum Krankheitsbild und zur Kategorie vorlagen, wurde auf eine Berücksichtigung von Effekten in statistischen Modellen verzichtet.

## 4 Ergebnisse

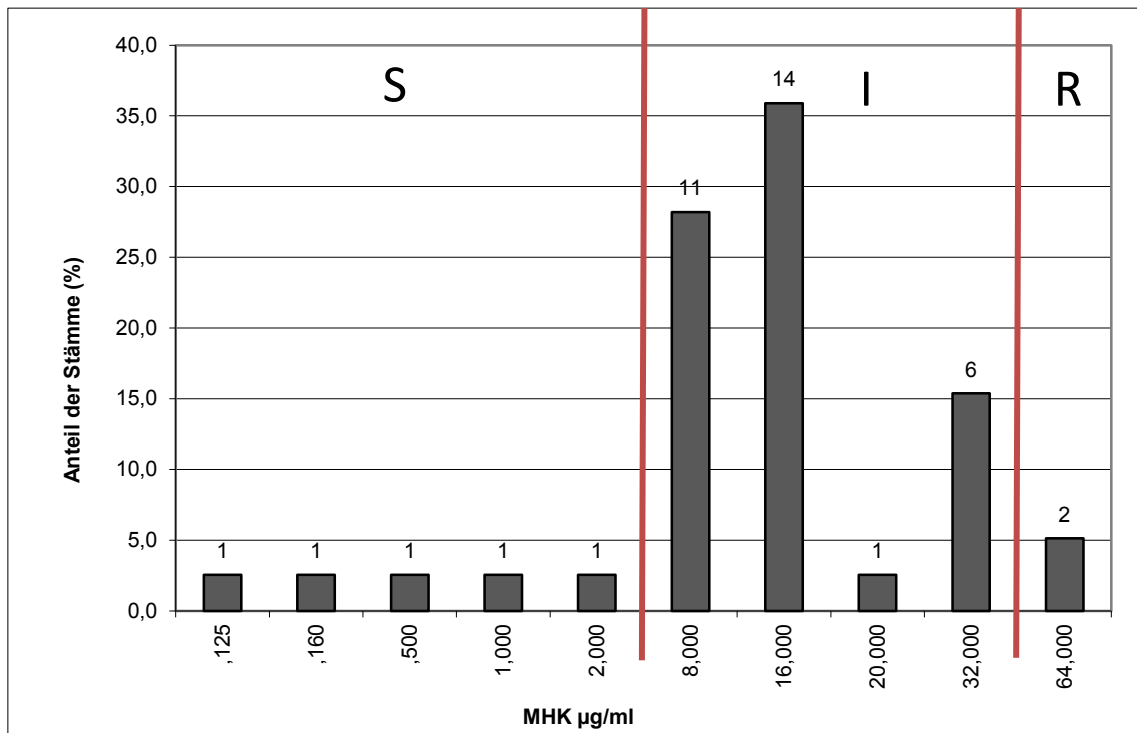
### 4.1 MHK-Werte von *B. hyodysenteriae*

Von den insgesamt untersuchten 64 *B. hyodysenteriae*-Stämmen lagen für 39 Stämme aus dem IHIT, Gießen die MHK-Werte für Tylosin und Lincomycin vor. Aufgrund der Einteilung nach Rønne und Szancer (1990) (Tabelle 1) sind 95 % als resistent und 2,5 % als mäßig empfindlich (intermediär) gegen Tylosin einzustufen (Abbildung 9).



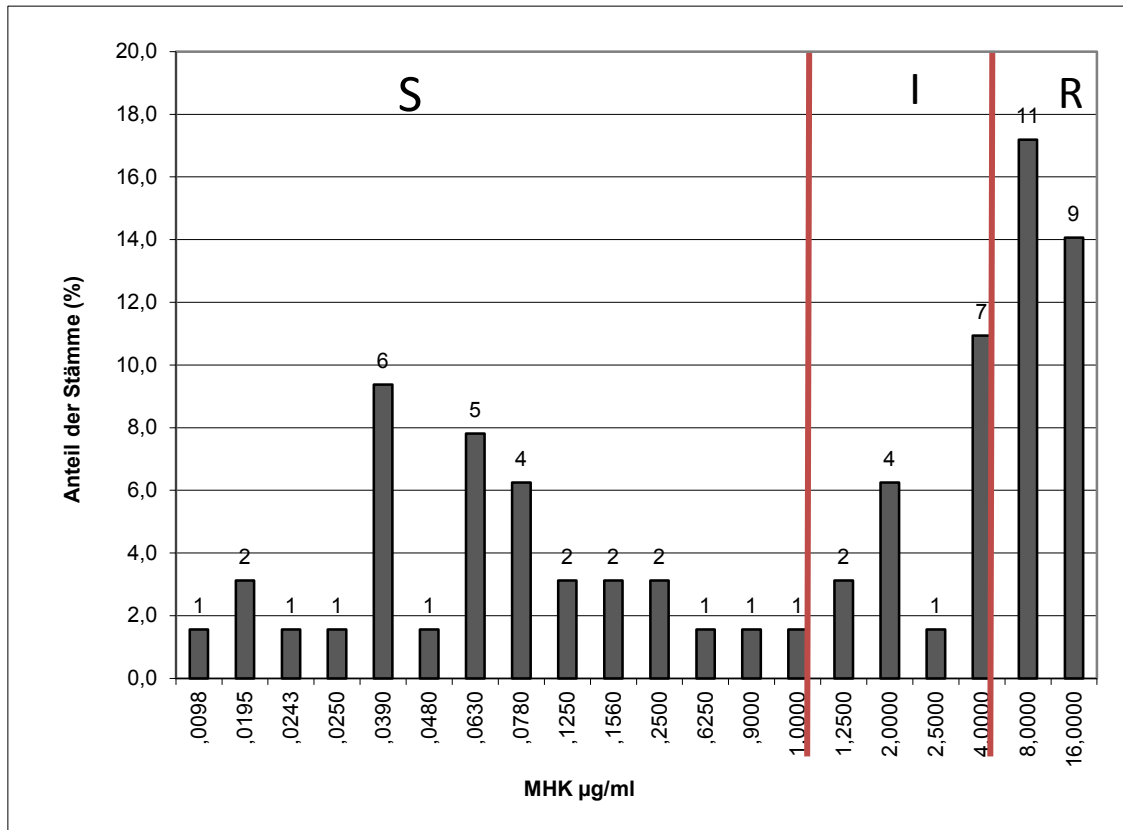
**Abbildung 9:** Verteilung der Isolate nach MHK (Tylosin) (n=39); Grenzwerte zur Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) (Rønne und Szancer [1990]) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl findet sich über den Balken.

Für Lincomycin war die Resistenzlage geringfügig günstiger. Die meisten Isolate (82 %) lagen im intermediären, 13 % im sensiblen und 5 % im resistenten Bereich (Abbildung 10).



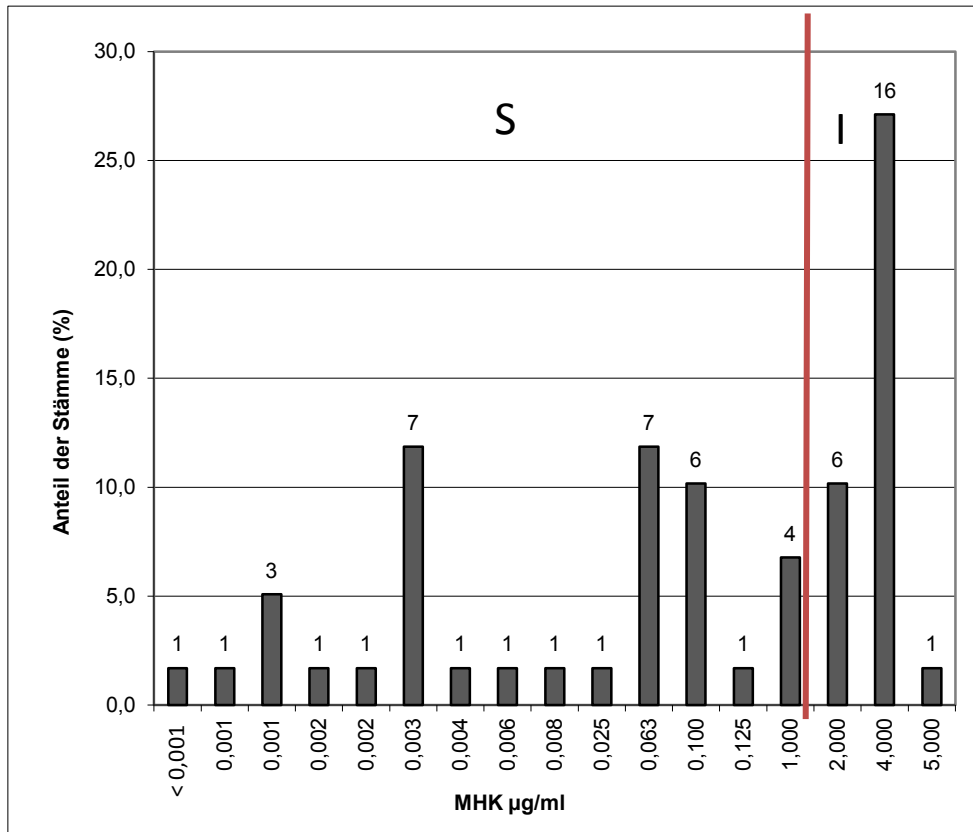
**Abbildung 10:** Verteilung der Isolate nach MHK (Lincomycin) (n=39), Grenzwerte zur Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) (Rønne und Szancer [1990]) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl findet sich über den Balken.

Die MHK-Werte für Tiamulin, die für alle 64 Stämme vorlagen, zeigten eine zweigipflige Verteilung mit einem Grenzwert von 0,625  $\mu\text{g/ml}$ . 45 % der Stämme lagen unterhalb, 55 % oberhalb des Grenzwertes. Aufgrund der Segregation wurde dieser MHK-Wert für die weiteren Auswertungen in Anlehnung an Karlsson et al. (2003) zur Einteilung der Stämme in sensibel und beginnend resistent herangezogen. Nach den MHK-Grenzwerten von Rønne und Szancer (1990) (Tabelle 1) waren 47 % sensibel und 31 % resistent (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Verteilung der Isolate nach MHK (Tiamulin) (n=64), Grenzwerte zur Einteilung in sensibel (S), intermediär (I) und resistent (R) (Rønne und Szancer [1990]) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl findet sich über den Balken.

Ähnlich wie für Tiamulin zeigte sich für Valnemulin eine zweigipflige Verteilung im Grenzbereich zwischen 0,125 µg/ml und 1 µg/ml (Abbildung 12). Für Valnemulin sind die Grenzwerte in Europa uneinheitlich. Nimmt man die in Deutschland gebräuchlichen Grenzwerte der Fa. Novartis für die Höchstdosierung von Valnemulin (11,7 mg/kg) an (empfindlich:  $\leq 1$  µg/ml; resistent:  $> 5$  µg/ml), liegen 54 % im sensiblen und 46 % im intermediären Bereich. Nach der dänischen Grenzwerteinteilung (empfindlich:  $< 0,5$  µg/ml; resistent:  $> 2$  µg/ml) sind 54 % sensibel, 17 % intermediär und 29 % resistent (Tabelle 1).

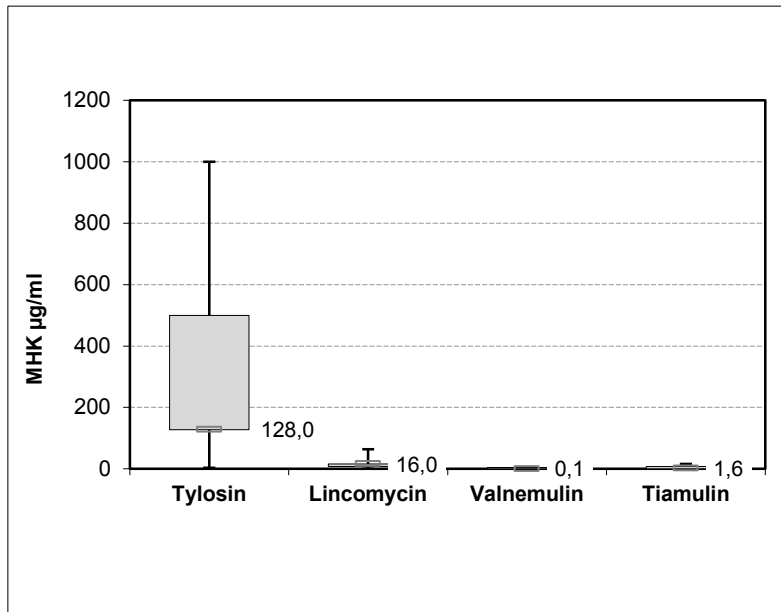


**Abbildung 12:** Verteilung der Isolate nach MHK (Valnemulin) (n=59). Die Grenzwerte der Fa. Novartis zur Einteilung in sensibel (S) und intermediär (I) sind markiert. Die jeweilige Fallzahl befindet sich über den Balken.

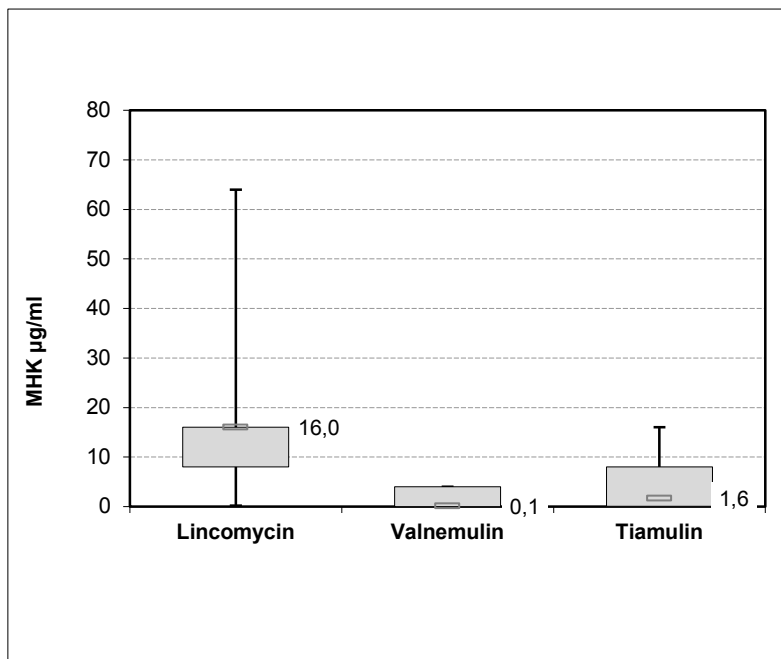
Die Verteilung der MHK-Werte für die geprüften Antibiotika über die untersuchten Stämme zeigen die Box-Whisker-Plots der Abbildungen 13 und 14. Fünfzig Prozent der Stämme hatten MHK-Werte für Tylosin zwischen 128 µg/ml und 500 µg/ml. Weitere 25 % der Stämme zeigten Werte zwischen 500 µg/ml und 1000 µg/ml sowie zwischen 3,9 µg/ml und 128 µg/ml.

Die MHK-Werte für die anderen Antibiotika waren signifikant niedriger als für Tylosin. Sie finden sich daher zur besseren Illustration in Abbildung 14 ohne Tylosin.





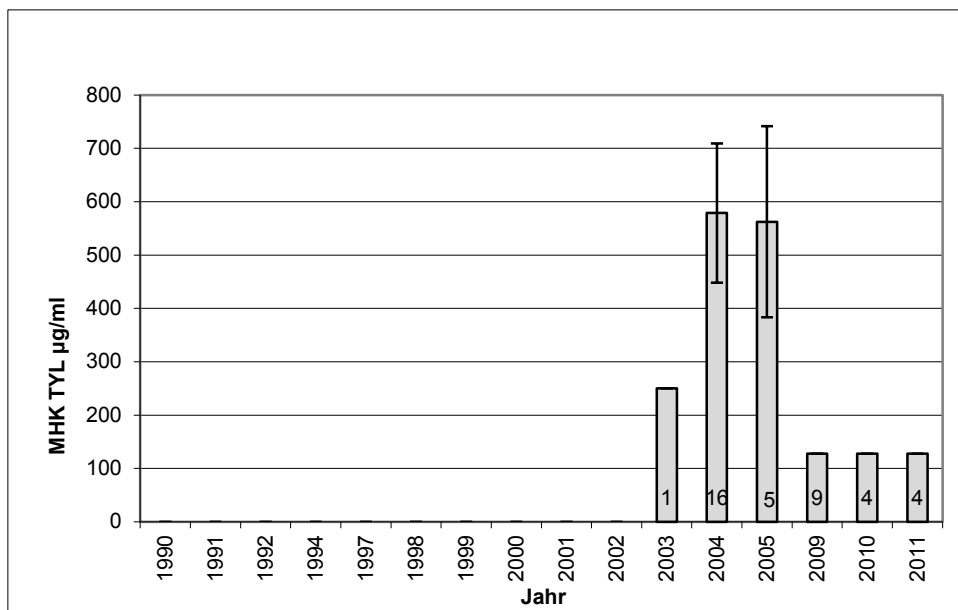
**Abbildung 13:** Box Plots mit Whisker: Darstellung der MHK-Verteilung für die untersuchten Antibiotika. Die Mediane werden als Querstrich und Zahlenwert in den Abbildungen angegeben (n= 39 [Tylosin; Lincomycin]; n= 59 [Valnemulin]; n= 64 [Tiamulin]).



**Abbildung 14:** Box Plots mit Whisker: Darstellung der MHK- Verteilung für die untersuchten Antibiotika. Die jeweiligen Mediane werden als Querstrich und Zahlenwert in den Abbildungen angegeben (n= 39 [Tylosin; Lincomycin]; n= 59 [Valnemulin]; n= 64 [Tiamulin]).

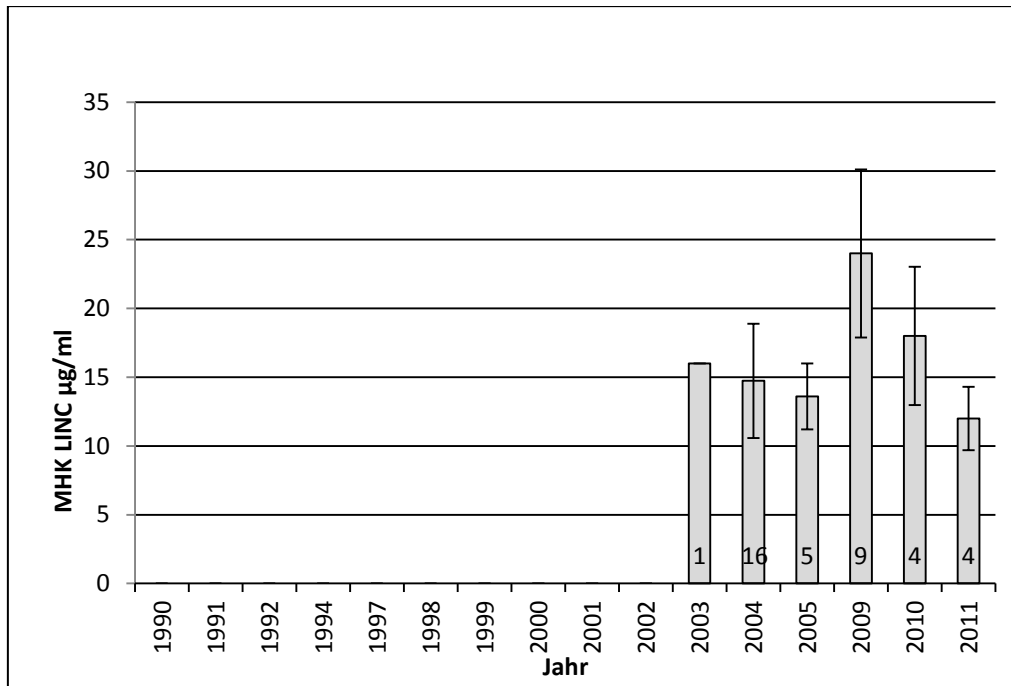
Fünfundzwanzig Prozent der MHK-Werte für Lincomycin lagen zwischen 8 und 16 µg/ml, 25 % zwischen 16 und 64 µg/ml und weitere 25% zwischen 0,16 und 8 µg/ml. Die entsprechenden Werte für Valnemulin betrugen 0,004 bis 4 µg/ml für 50 % der Stämme, 4 µg/ml bei 25 % und 0,008 bis 0,004 µg/ml für weitere 25 % der Stämme. Für Tiamulin lagen die MHK-Werte für 50 % der Isolate zwischen 0,063 und 8 µg/ml, für 25 % zwischen 0,0207 und 0,063 µg/ml und für 25 % zwischen 8 und 16 µg/ml (Abbildung 14).

Die MHK-Werte von Tylosin und Lincomycin lagen nur für die Isolate aus den Jahren 2003 bis 2011 vor.



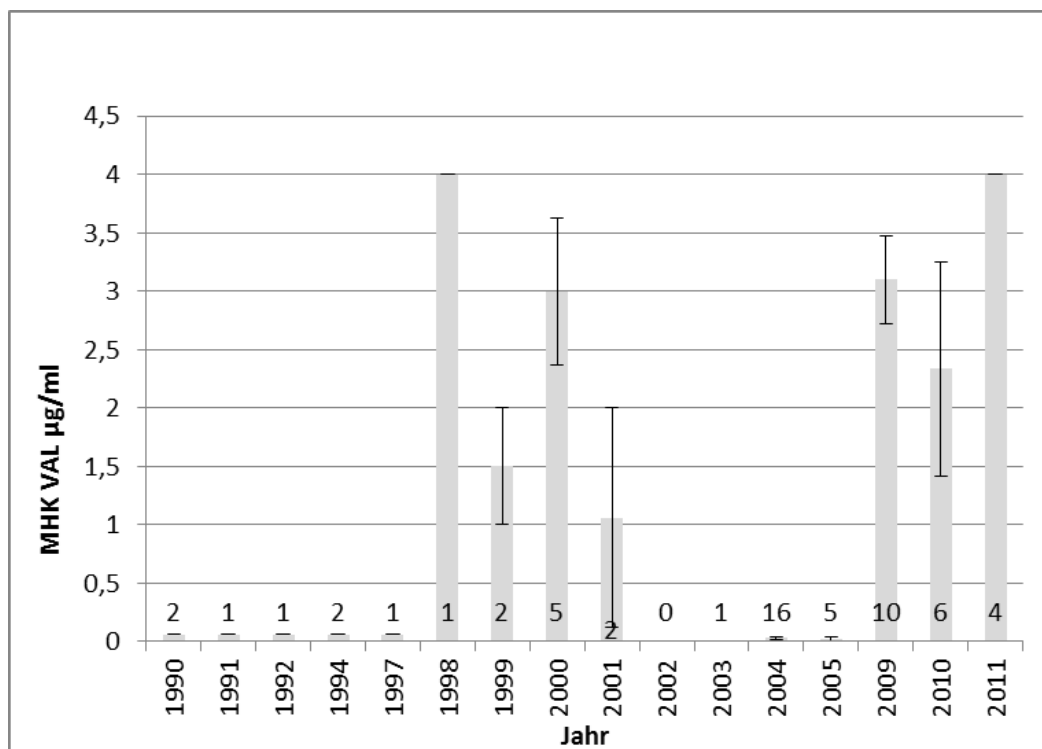
**Abbildung 15:** Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=39]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Tylosin).

Im Jahre 2003 wurde lediglich ein Stamm mit einem MHK-Wert von 250 µg/ml für Tylosin getestet. In den Jahren 2004 und 2005 lagen die durchschnittlichen MHK-Werte der untersuchten Stämme deutlich höher, bei 578 und 562 µg/ml. In den Jahren 2009 bis 2011 wurden niedrigere durchschnittliche MHK-Werte von 128 µg/ml festgestellt (Abbildung 15). Die MHK-Werte für Lincomycin blieben in den Jahren 2003 bis 2005 relativ stabil, bei ca. 14 µg/ml. Im Jahr 2009 stieg der MHK-Wert auf einen Spitzenwert von 24 µg/ml an und sank in 2011 auf 12 µg/ml ab (Abbildung 16).

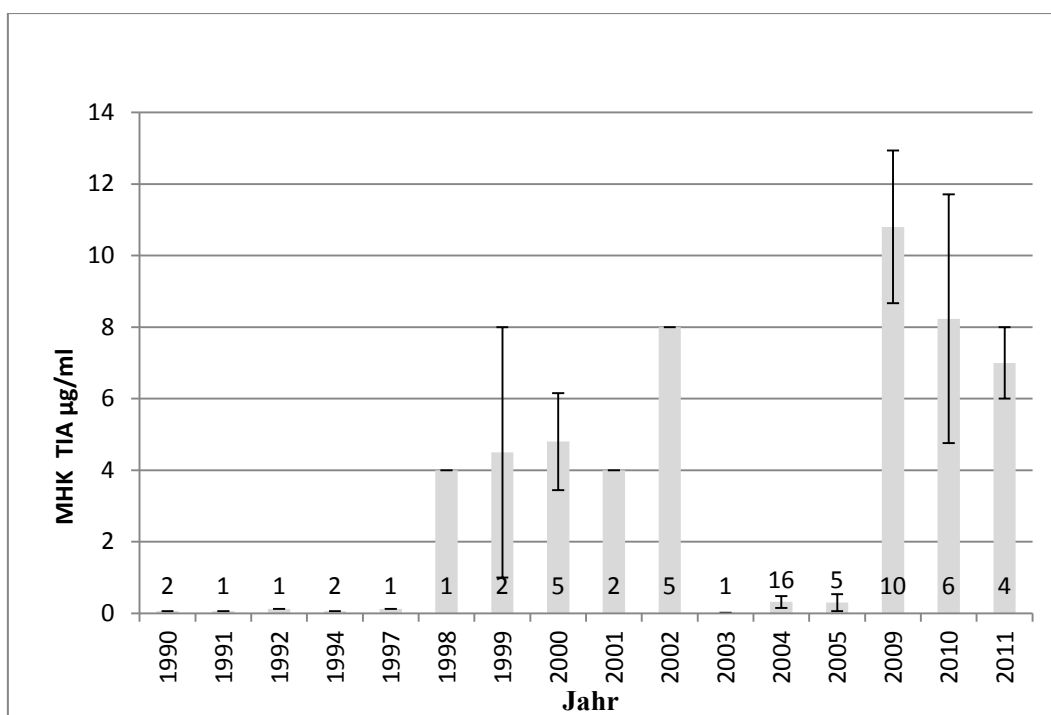


**Abbildung 16:** Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=39]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Lincomycin).

Für Tiamulin und Valnemulin konnten MHK-Werte für den Versuchszeitraum zwischen 1990 und 2011 berechnet werden. Die MHK-Werte beider Antibiotika zeigten eine ähnliche Entwicklung, mit signifikanten ( $p < 0,001$ ) Anstiegen 1998 und 2009. Zwischen 1998 und 2001 sowie zwischen 2009 und 2011 ließen die MHK-Werte im Durchschnitt eine Einstufung der Stämme als intermediär und empfindlich zu. Vor 1998 und zwischen 2002 und 2005 lagen die MHK-Werte hingegen durchwegs im sensiblen Bereich (Abbildungen 17 und 18).



**Abbildung 17:** Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=59]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Valnemulin).



**Abbildung 18:** Zahl der Isolate (über der x-Achse [n=64]) und deren durchschnittliche MHK-Werte (Mittelwert mit Standardirrtum) (y-Achse) über den Versuchszeitraum (Tiamulin).

## 4.2 Mutationen in der 23S rRNA

In den insgesamt 64 untersuchten Stämmen wurden 13 SNPs (Single Nucleotid Polymorphisms) in Domäne V der 23S rRNA identifiziert (Tabelle 10). Keiner der SNPs ist über hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen direkt in die Bindung von Tiamulin an das Ribosom involviert. Mittels Regressionsanalyse wurde für den SNP an Position 2535 der 23S rRNA nahe der Signifikanzgrenze ( $p = 0.054$ ) eine Assoziation zu den MHK-Werten für Tylosin hergestellt.

**Tabelle 10:** Darstellung der Häufigkeit des Vorkommens (in %) von Genvarianten an polymorphen Nukleotiden relativ zum Referenzstamm anhand der 64 untersuchten Stämme.

Referenznukleotid/Position	G	A	T	C	pTYL	pLINC	pVAL	pTIA
23S rRNA								
T/1944	1,5		98,5		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/2057 <sup>1</sup>	98,5	1,5			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
A/2058 <sup>1</sup>	1,5	6,1	92,4		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/2116	98,5	1,5			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C/2146 <sup>1</sup>			10,6	89,4	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
C/2165	95,5		1,5	3	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T/2202	1,5	95,5	3		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/2221	3		95,5	1,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/2365 <sup>1</sup>	89,4		1,5	9,1	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/2481	97	1,5	1,5		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
T/2528	1,5		98,5		n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
G/2535 <sup>1</sup>	80,3	19,7			0.054	n.s.	n.s.	n.s.
C/2611 <sup>1</sup>			1,5	98,5	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
L3								
A/443	26,7	73,3			n.s.	n.s.	0.004	0.002

p TYL( LINC, VAL, TIA): Signifikanzniveau der Assoziation einer Variante zur MHK von Tylosin (Lincomycin, Valnemulin, Tiamulin).

n.s. = nicht signifikant

<sup>1</sup>SNPs, deren Vorkommen bereits in der Literatur beschrieben ist

### 4.3 Mutationen im ribosomalen Protein L3

Im ribosomalen Protein L3-Gen wurden in den untersuchten 64 Stämmen insgesamt 4 SNPs identifiziert. Drei dieser SNPs kodieren die 3. Position im Basentriplett und können als stille Mutationen keinen Aminosäureaustausch bewirken. Der SNP an Position 443 im Gen (Gen® Bank: *B. pilosicoli* AF114845 bzw. NC\_012225.1) (Tabelle 10) kodiert für die zweite Stelle des Basentriplets. AAC kodiert für Asparagin, AGC für Serin (Abbildungen 19 und 20).

ATGGTAGGAATAATTGGCAAAAAATTGGGTATGACAACAGTTTTCGATGAGACTGGTAATGCTATAGCAG  
TAACAGTTGTAGAGGCTGGACCATGCACAGTTATGCAGATAAGAGATAATGAGAAAGATGGCTACAGTGC  
TATTCAATTAGGCTACGGTGCCGTAAGAAATATTTAAAAGAGTTTCAAGATGGACGATGCTAGTTCTTACACAGTAGGTC  
GCAAATTTAGAGCCTAAGAAATATTTAAAAGAGTTTCAAGATGGACGATGCTAGTTCTTACACAGTAGGTC  
AAGAGCTTAAAGCAGATATATTTCAAGCAGGCGATTTTATAGATGTTAGTTCTTGAAGTAAAGGTAGAGG  
TTTTGCCGGCGTAATGAAAAGACATAATTATGACGGCGGTCTATGAGCCATGGTTCTAACTTTAGAAGA  
AGAGCAGGTTCTATAGGTTGTAAACAGCTACCCTGCAAGAGTATGGAAAGGTAAAGGTATGCCTGGACATA  
TGGGTAATACTTTGACTACTATACAAAACCTAAAAGTAGTTGAAATAAGACCAGATGATAATTTGATTAT  
GATAAAAGGTGCTATACCAGGTGCTATAAATAGCATAGTGAAATTAACATCAGCAGTAAAGAAACGTAAT  
AAGAAGAAAACTCAATGAATTAA

A = 2432545 (Erste Base L3-Gen)

A = 2433198 (Letzte Base L3-Gen)

A = L443 (Position 2 im Triplet)

**Abbildung 19:** Gensequenz des ribosomalen Proteins L3 von *B. hyodysenteriae* (NC\_012225.1).

MVGIIGKKLGMTTVFDETGNIAIAVTVVEAGPCTVMQIRDNEKDGYSAILQGYGAVK  
EKHLKKPQIGQFKKANLEPKKYLKEFRMDDASSYTVGQELKADIFQAGDFIDVSSLS  
KGRGFAGVMKRHNYDGGPMSHGSNFRRRAGSIGCN/S(148)SYPARVWKGKGMPGH  
MGNTLTITQNLKVVEIRPDDNLIMIKGAIPGAINSIVKLTSVKKRNKKKNSMN

N = Asparagin

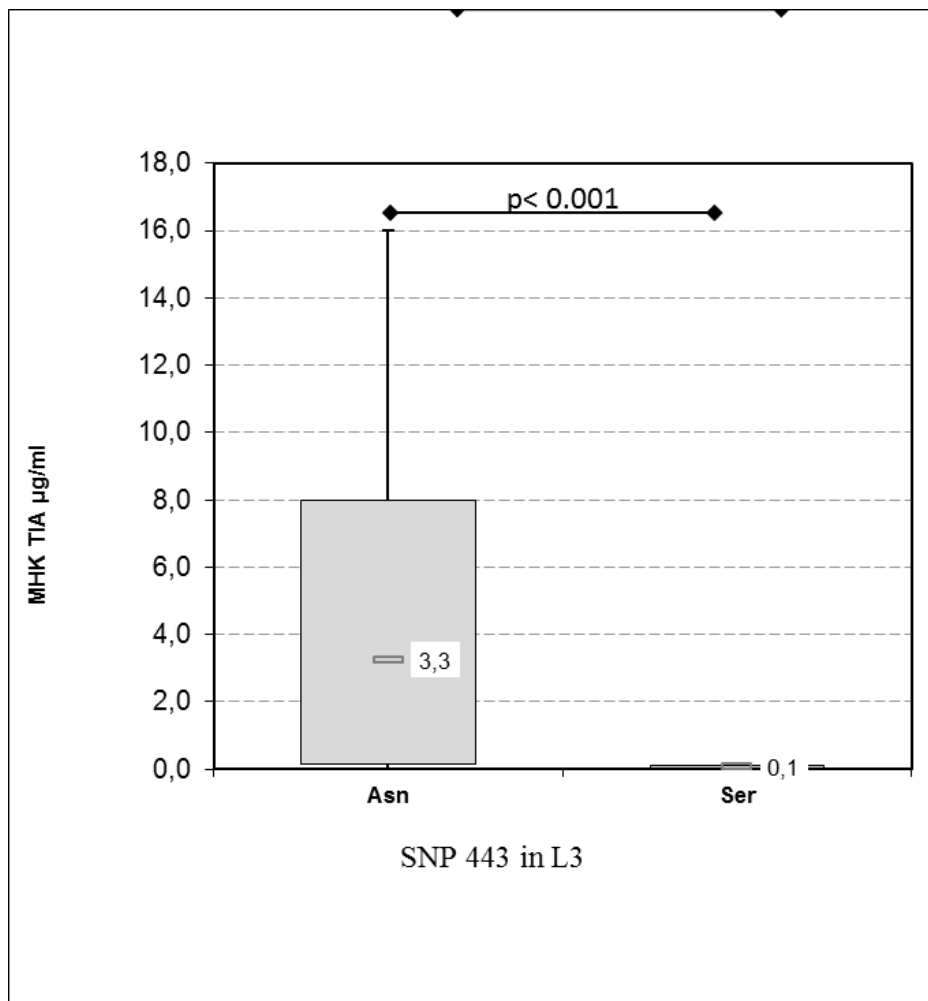
S = Serin

**Abbildung 20:** Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L3 von *B. hyodysenteriae* (NC\_012225.1)

Der SNP<sub>443</sub>, der für Serin (AGC) kodiert, ist in 17 von 61 Isolaten (27 %) nachweisbar. Zwischen SNP<sub>443</sub> und dem MHK-Wert für Tiamulin konnte eine signifikante Assoziation ( $p < 0,001$ ) errechnet werden. Serin kam in 89 % der Isolate mit einem MHK-Wert von  $\leq 0,625$  µg/ml vor (Abbildung 21).

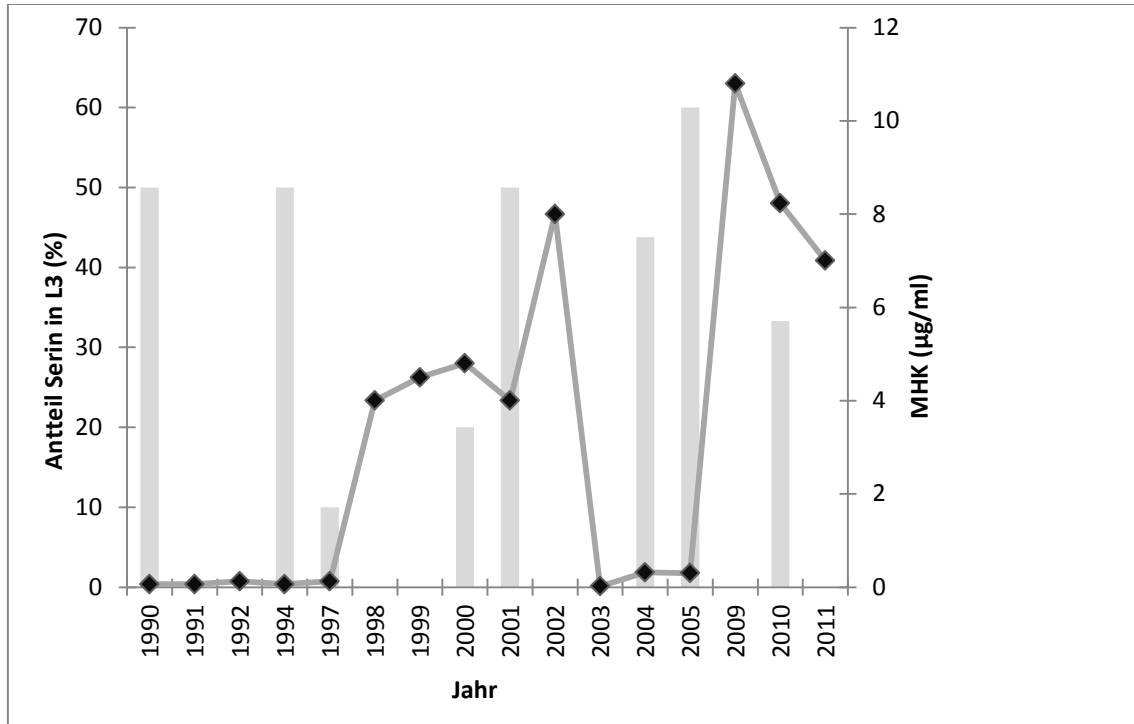
Mit Asparagin lag der MHK-Wert bei 73 % der Stämme über dem genannten Grenzwert von 0,625 µg/ml. Die übrigen Stämme (27%) waren sensibel.

Insgesamt konnten damit aufgrund von SNP<sub>443</sub> die Empfindlichkeit/Resistenz von 77 % der Stämme korrekt prognostiziert werden.



**Abbildung 21:** Einfluss des SNPs an Position 443 im Gen des ribosomalen Proteins L3 auf die MHK-Werte (Tiamulin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n=64).

Vergleicht man den Anteil der Serin-Variante und die MHK-Werte über die Jahre, so zeigt sich auch hier ein Zusammenhang zwischen der Genvariante Serin und niedrigen MHK-Werten. Allerdings blieb eine Restvariabilität erhalten (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Zusammenhang zwischen der Variante Serin im ribosomalen Protein L3 und den MHK-Werten von Tiamulin gegenüber *B. hyodysenteriae*-Isolaten zwischen 1998-2012.

Trotz des signifikanten Zusammenhangs zwischen L3<sub>443</sub> und der Höhe der MHK-Werte blieb eine Restungenauigkeit durch eventuelle Interaktion mit Genvarianten anderer Gene oder Genpositionen.

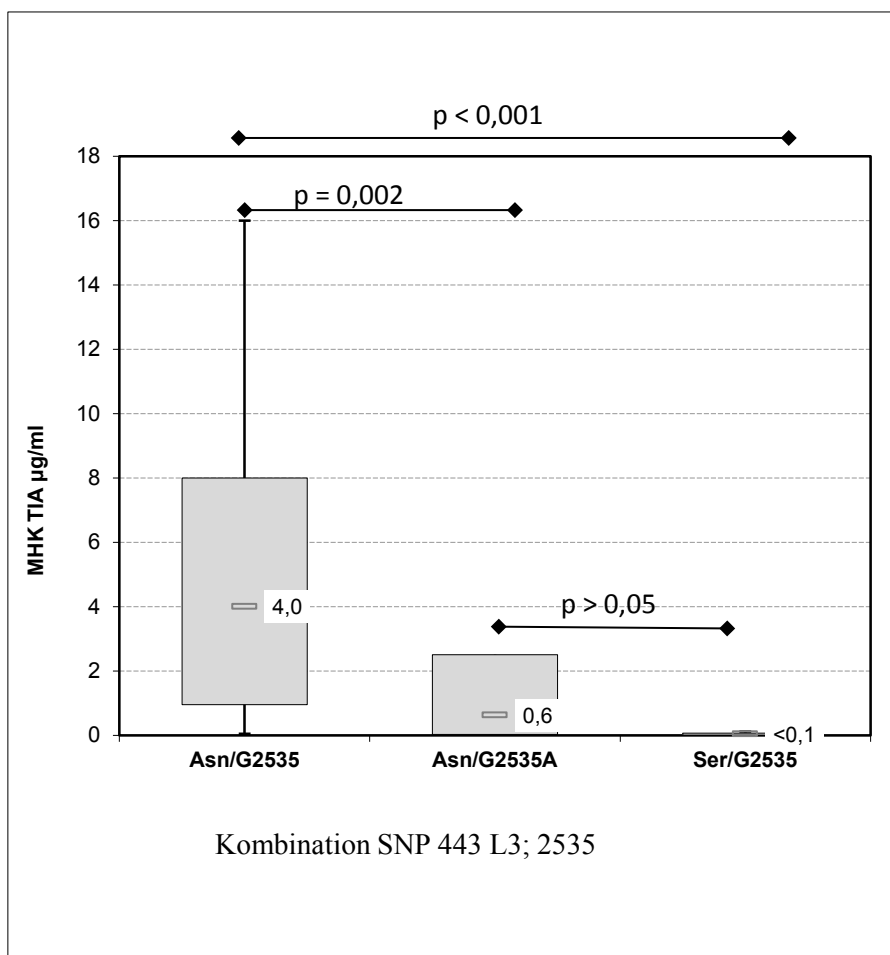
#### 4.4 Einfluss kombinierter Genvarianten

In den 64 untersuchten Stämmen wurden die SNPs, die Assoziationen zu MHK-Werten aufwiesen, kombiniert betrachtet. Die Kombination des SNPs L3<sub>443</sub> mit dem SNP an Position 2535 der 23S rRNA ergab die Varianten Asn/G2535, Asn/G2535A und Ser/G2535. Bei der Darstellung der Kombinationen der Varianten wurde bezüglich der L3-Ser Variante nur die Kombination mit G2535 nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte sich eine Aufspaltung der L3-Asn Variante in Asn/G2535 und Asn/G2535A (Abbildung 23).



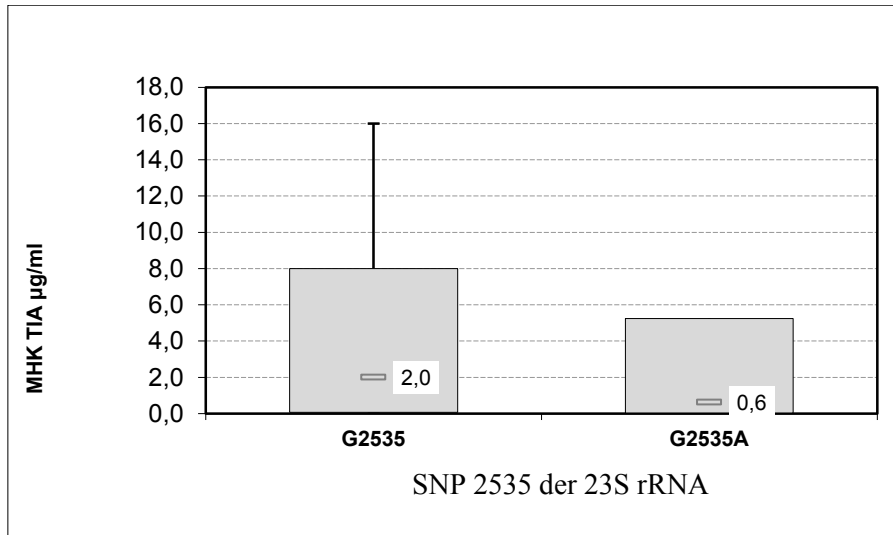
Die aufgezeigten Kombinationen der SNPs L3<sub>443</sub> in L3 und 2535 in der 23S rRNA waren signifikant mit den Tiamulin-MHK-Werten assoziiert ( $p = 0,002$ ). Eine Aufspaltung der L3-Ser Stämme wurde durch Hinzunahme der G2535 Variante nicht erreicht, da die Kombination Ser/G2535A unter den 64 untersuchten Stämmen nicht vorkam. Damit blieb auch die korrekte Zuordnung innerhalb der L3-Ser Gruppe (Abbildung 23) unbeeinflusst.

Mit der Aufspaltung der L3-Asn Variante (Abbildung 21) in Asn/G2535 und Asn/G2535A (Abbildung 23), konnte hingegen ein Anteil der unerwartet sensiblen Stämme durch die offensichtlich MHK-absenkende Wirkung der G2535A Variante erklärt werden. Hierdurch stieg die korrekte Zuordnung der Stämme innerhalb der L3-Asn Gruppe von 73 % auf 79 % an. Innerhalb der G2535 Stämme konnte damit die Aussagekraft durch Einbeziehung der L3-SNPs von 77 % auf 82 % gesteigert werden. Allerdings war bei Vorliegen der G2535A Variante praktisch keine Aussage bezüglich der Resistenzlage der Stämme, wenngleich auf niedrigem Resistenzniveau (Maximum von 2,5 µg/ml) möglich (Abbildung 23).

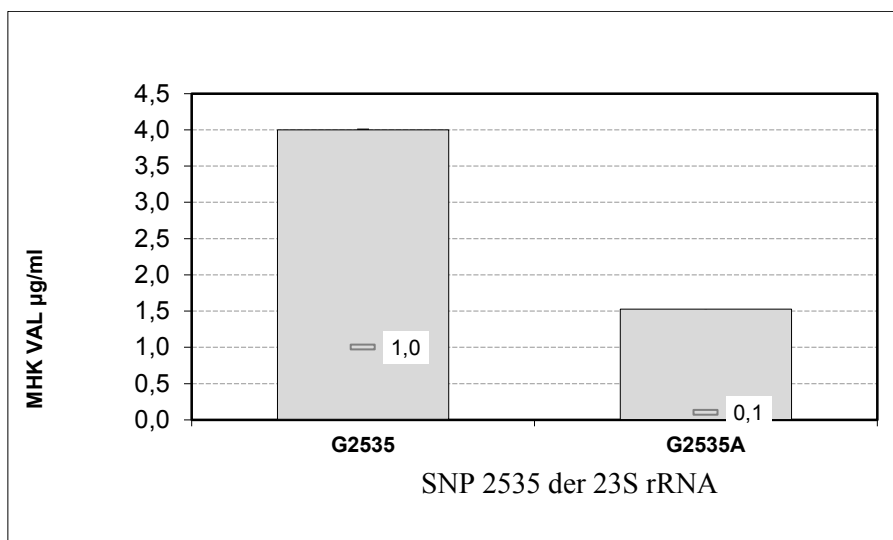


**Abbildung 23:** Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK- Werte (Tiamulin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt ( $n = 34$  [Asn/G2535];  $n = 12$  [Asn/G2535A];  $n = 16$  [Ser/G2535]).

Innerhalb L3-Asn zeigte sich der Effekt des SNPs 2535 auf die Tiamulin MHK-Werte ebenfalls signifikant ( $p = 0,002$ ) (Abbildung 24). Stämme mit der Variante G waren resistenter gegen Tiamulin als Stämme mit der Variante A. Die entsprechenden Mediane lagen bei 2  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 0,6  $\mu\text{g/ml}$ .



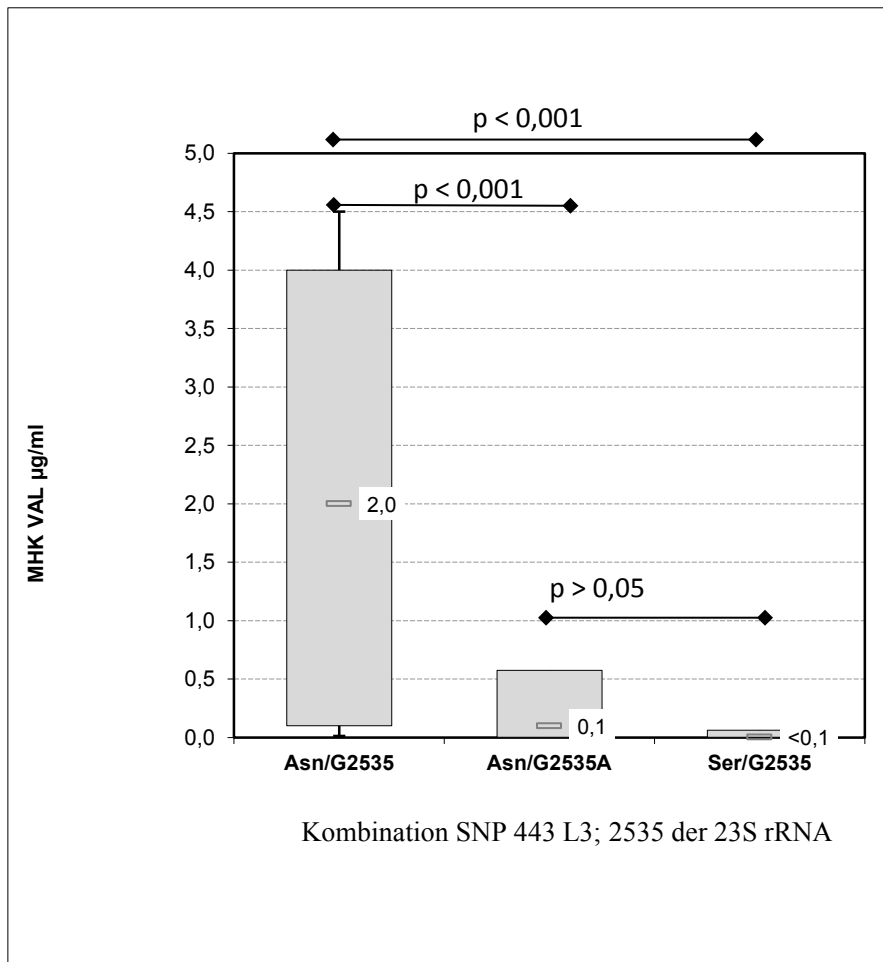
**Abbildung 24:** Einfluss des SNPs 2535 der 23S rRNA auf die MHK-Werte (Tiamulin). Der Median ist als Querstrich mit Zahlenwert dargestellt ( $n=51$  [G2535];  $n=13$  [G2535A]).



**Abbildung 25:** Einfluss des SNPs 2535 der 23S rRNA auf die MHK-Werte (Valnemulin). Der Median ist als Querstrich mit Zahl dargestellt ( $n=47$  [G2535]  $n=12$  [G2535A]).

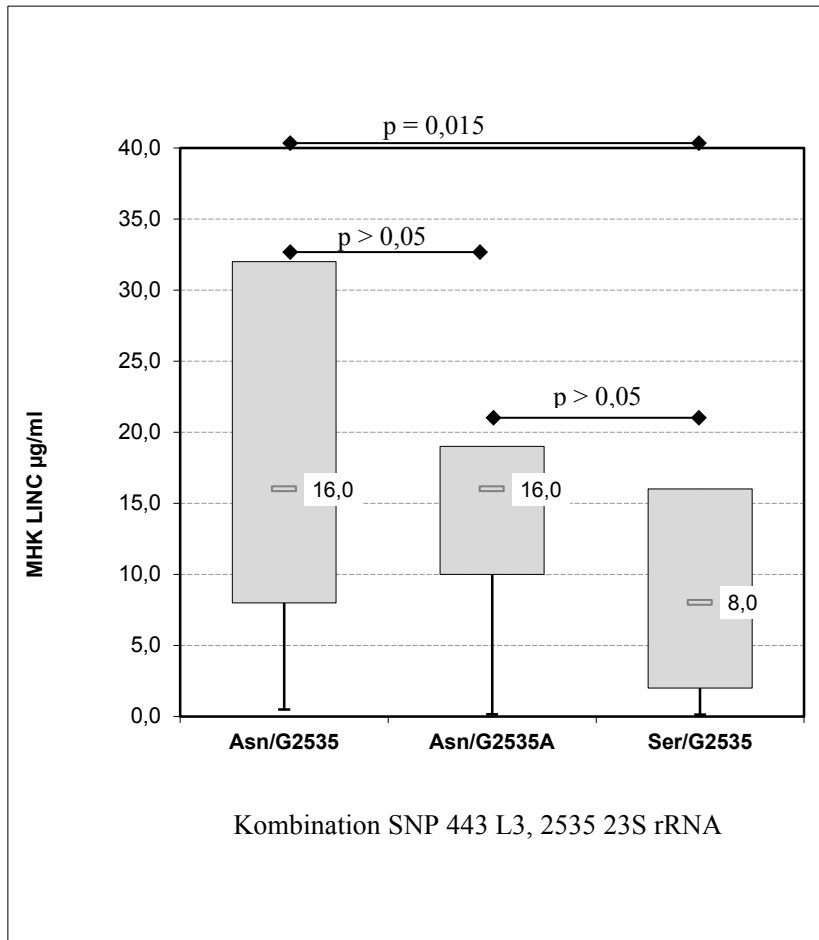
Der aufgezeigte Effekt der G2535A Variante wurde für Valnemulin-MHK-Werte noch deutlicher ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 25). Die Mediane der MHK-Werte differierten zwischen Stämmen mit unterschiedlichen 2535-Varianten um den Faktor 10 (Abbildung 25). Die

MHK-Werte der Stämme mit G2535A Variante gingen im Vergleich zu Tiamulin (5 µg/ml) nicht über 1,5 µg/ml hinaus (Abbildungen 24 und 25).



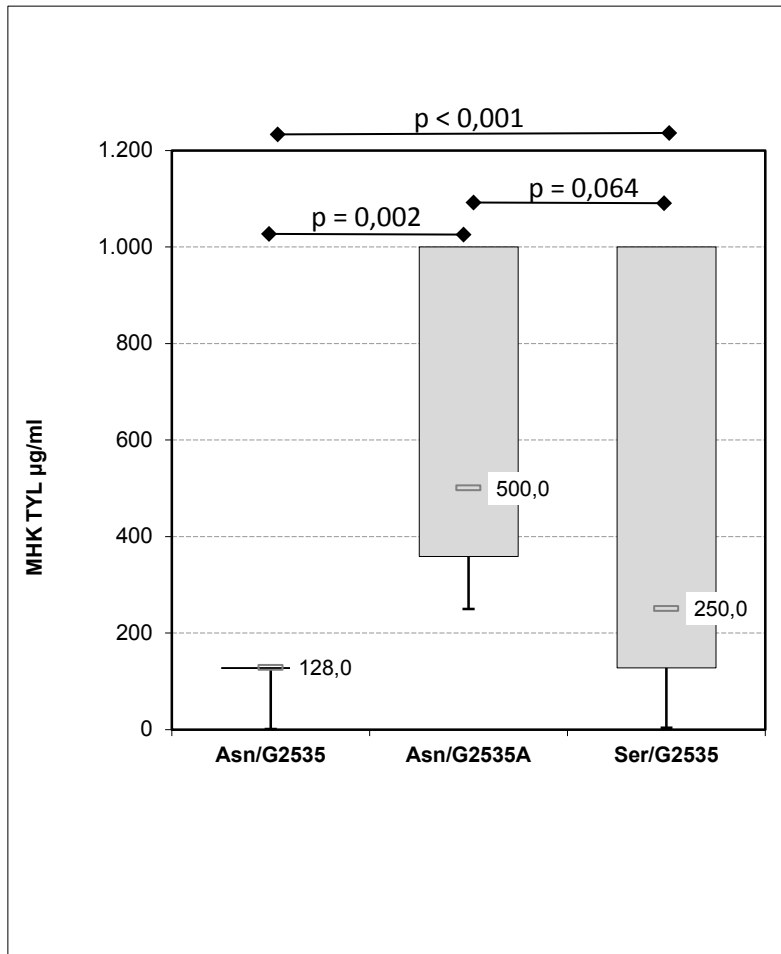
**Abbildung 26:** Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK-Werte (Valnemulin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n= 30 [Asn/G2535]; n= 12 [Asn/G2535A]; n= 16 [Ser/G2535]).

Ein grundsätzlich ähnliches Bild wie für Tiamulin und Valnemulin ergab sich auch für Lincomycin, wenngleich die MHK-Werte insgesamt in den resistenten Bereich verschoben waren. Dabei hatten 50% der Stämme mit der Kombination Asn/G2535 MHK-Werte zwischen 8-32 µg/ml und 50% der Stämme mit der Kombination Ser/G2535 MHK-Werte zwischen 2-16 µg/ml und waren damit signifikant verschieden ( $p = 0,015$ ). 50 % der Stämme mit der Kombination Asn/G2535A hatten MHK-Werte zwischen 10 und 19 µg/ml und unterschieden sich damit nicht signifikant von den 2 weiteren Genvarianten (Abbildung 27).



**Abbildung 27:** Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK-Werte (Lincomycin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n= 19 [Asn/G2535]; n= 9 [Asn/G2535A]; n= 16 [Ser/G2535]).

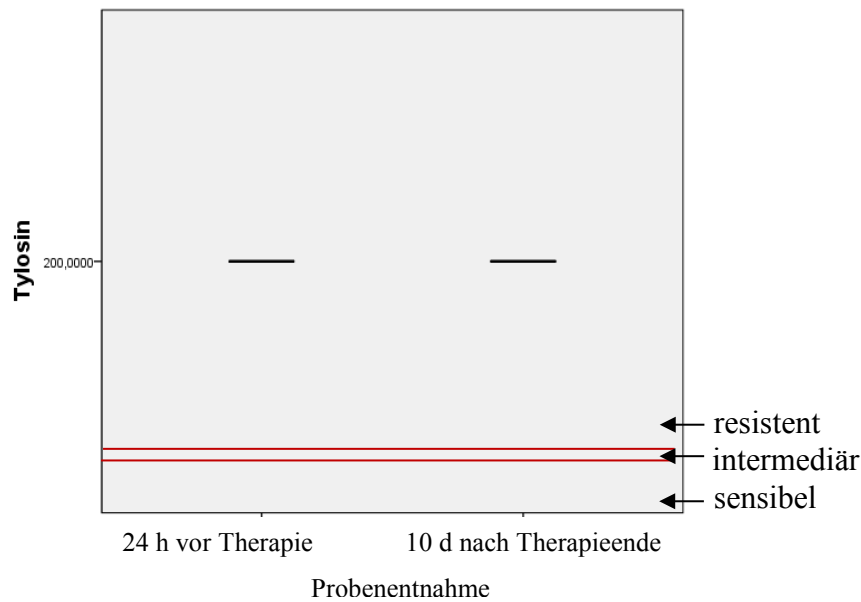
Ein konträres Bild ergab sich hingegen für Tylosin (Abbildung 28). Insgesamt lagen die MHK-Werte für alle Varianten deutlich über denen der Pleuromutiline (Abbildungen 23, 26 und 28). Innerhalb der Variante Asn/G2535 streuten die Werte der Pleuromutiline am stärksten und hatten den höchsten Median (Abbildungen 23 und 26). Tylosin hat die geringsten Streuungen innerhalb der Box plots für Asn/G2535 und der Median ist mit 128 µg/ml der niedrigste der 3 Varianten. Asn/G2535A kodiert für Stämme, deren MHK-Werte zu 50% zwischen 359 µg/ml und 1000 µg/ml liegen und deren Median 500 µg/ml beträgt. Die – innerhalb der Pleuromutiline - empfindlichste Variante Ser/G2535 hat für die Werte von Tylosin die breiteste Verteilung mit 50 % zwischen 128 µg/ml und 1000 µg/ml. Der Median liegt bei 250 µg/ml (Abbildung 28).



**Abbildung 28:** Einfluss der Kombination der SNPs (443 L3; 2535) auf die MHK-Werte (Tylosin). Die Signifikanz findet sich über den Plots, der Median wird als Querstrich und Zahl dargestellt (n= 19 [Asn/G2535]; n= 9 [Asn/G2535A]; n= 16 [Ser/G2535]).

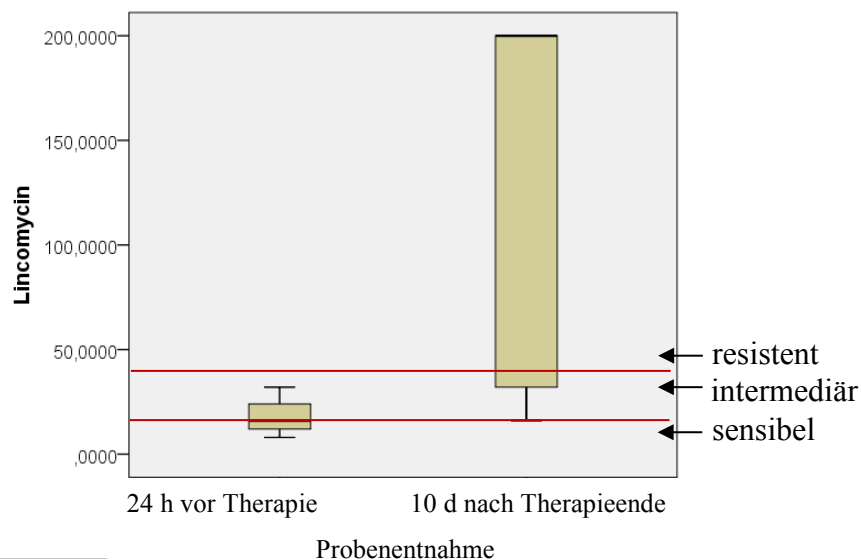
#### 4.5 Einfluss einer Therapie mit Tiamulin auf die MHK-Entwicklung von Bakterienpopulationen im Feld

In einem Betrieb konnte die MHK-Entwicklung von *B. hyodysenteriae* durch Beprobung von durchfallerkranken Tieren vor und nach 3-tägiger parenteraler Tiamulintherapie nachvollzogen werden. Die MHK-Werte für Tylosin lagen sowohl vor, als auch nach der Behandlung im resistenten Bereich (> 128 µg/ml) (Abbildung 29).



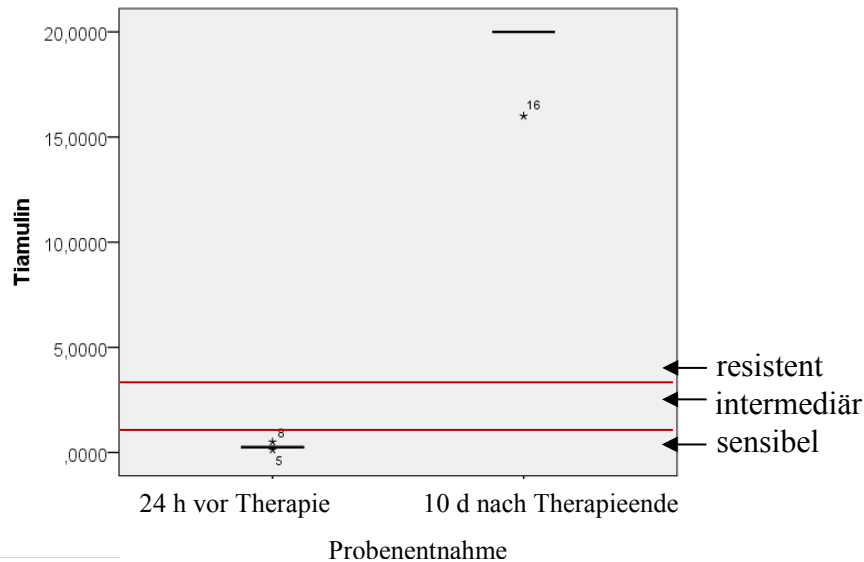
**Abbildung 29:** Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte von 10 *B. hyodysenteriae*-Stämmen(Tylosin). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Rønne und Szancer 1990).

Vor der Behandlung lagen die MHK-Werte für Lincomycin zwischen 8 und 16 µg/ml und waren nach der Behandlung angestiegen auf 16-32 µg/ml (Abbildung 30).

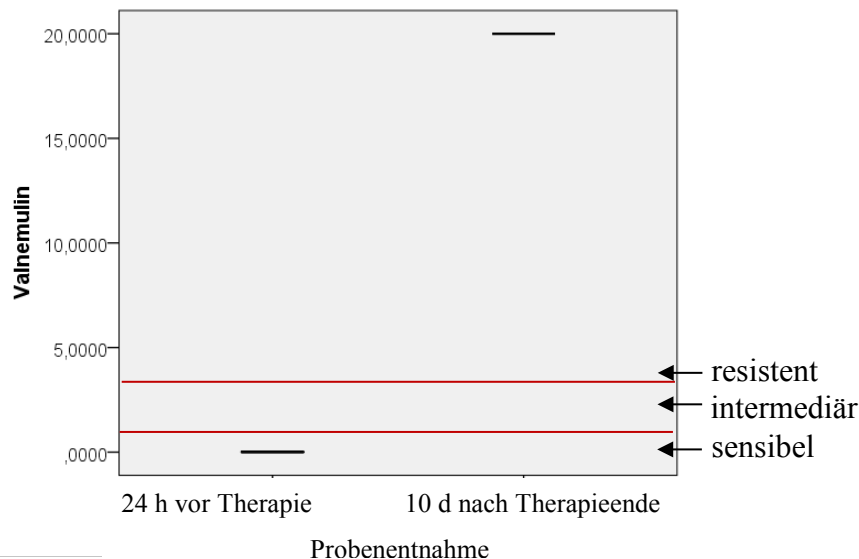


**Abbildung 30:** Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte von 10 *B. hyodysenteriae*-Stämmen (Lincomycin). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Rønne und Szancer 1990).

Für Tiamulin und Valnemulin gab es eine einheitliche Verteilung. Während die MHK-Werte für beide Antibiotika vor der Therapie im sensiblen Bereich bei 0,25 µg/ml bzw. 0,004-0,008 µg/ml lagen, waren die MHK-Werte bereits nach 3-tägiger parenteraler Tiamulin-Behandlung im resistenten bzw. intermediären Bereich bei 16 µg/ml bzw. 4µg/ml (Abbildungen 31 und 32).



**Abbildung 31:** Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte von 10 *B. hyodysenteriae*-Stämmen (Tiamulin) (n=8). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Rønne und Szancer 1990).



**Abbildung 32:** Einfluss einer 3-tägigen parenteralen Tiamulin-Therapie auf die MHK-Werte von 10 *B. hyodysenteriae*-Stämmen (Valnemulin) (n=5). Die MHK-Grenzwerte von intermediär, sensibel und resistent sind durch die Markierungen dargestellt (Fa. Novartis).

Während in einem Tier vor der Therapie *B. hyodysenteriae*-Stämme mit der Variante G2535 detektiert wurden, wurden nach Beendigung der Therapie im gleichen Tier nur noch Stämme mit der Variante G2535A nachgewiesen.

#### 4.6 Mutationen in den ribosomalen Proteinen L4, L2 und L22

Im ribosomalen Protein L22 der 64 untersuchten Stämme waren keine SNPs vorhanden. Im ribosomalen Protein L2 wurden 4 SNPs, im ribosomalen Protein L4 2 SNPs identifiziert (Tabelle 11). Bei all diesen SNPs handelt es sich allerdings um stille Mutationen. Damit wurden sie keinen weiteren Betrachtung unterzogen.

**Tabelle 11:** Darstellung der Häufigkeit des Vorkommens (in %) von Genvarianten an polymorphen Nukleotiden relativ zum Referenzstamm anhand der 64 untersuchten Stämme.

Position im Gen	G	A	T	C
273 L4	14			86
531 L4			83	17
342 L2	45			55
417 L2			89	11
663 L2			18	82
753 L2			55	45



## 5 Diskussion

Aufgrund der weit verbreiteten Resistenzen von *B. hyodysenteriae* gegen Tylosin und Lincomycin sind Pleuromutiline in Deutschland die Antibiotika der Wahl zur Behandlung der Dysenterie. Resistenzentwicklungen gegen Tiamulin und Valnemulin werden jedoch europaweit immer häufiger beobachtet (Karlsson et al., 2003; Lobová et al., 2004; Rohde et al., 2004).

Die Bindungsstellen von Pleuromutilinen und deren Wirkweise im Ribosom wurden bereits eingehend erforscht (Ban et al., 2000; Nissen et al., 2000; Schlünzen et al., 2004). Insbesondere bei Erregern wie *B. hyodysenteriae*, die nur ein RNA Operon besitzen, sind ribosomale Mutationen resistenzinduzierend (Bellgard et al., 2009; Vester und Douthwaite, 2001; Zuerner et al., 1994). Auf dieser Basis sollten in der vorliegenden Arbeit die an der Bindung der Pleuromutiline beteiligten Regionen, insbesondere die Domäne V der 23S rRNA und das ribosomale Protein L3, mittels vergleichender Sequenzanalysen in 64 Stämmen von *B. hyodysenteriae* aus Deutschland untersucht werden. Da das Stammkollektiv über einen Zeitraum von 1990 bis 2011 gesammelt wurde, konnte auch der zeitliche Einfluss auf die Veränderung der MHK-Werte berücksichtigt werden. Da die Stämme jedoch nicht zufällig entnommen wurden, können anhand der Daten keine epidemiologischen Rückschlüsse auf die Gesamtsituation in Deutschland gezogen werden. Die ungünstige Resistenzlage von Brachyspiren gegenüber Makroliden und Lincosamiden bestätigte sich in der vorliegenden Untersuchung. 95 % der Isolate waren gegen Tylosin resistent. 82 % der Isolate waren noch mäßig empfindlich gegenüber Lincomycin. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung decken sich mit einer kürzlich durchgeführten Studie aus Spanien, die für Lincomycin und Tylosin 70 % bzw. 98 % resistente Isolate nachwies (Hidalgo et al., 2011). Übereinstimmend ist damit der Einsatz von Tylosin und Lincomycin zur Therapie der Dysenterie aufgrund der jetzigen Antibiotika-Empfindlichkeit abzulehnen. Die Resistenz gegenüber Tylosin, Lincomycin und Streptograminen (MLS<sub>b</sub>) basiert auf einer Mutation in der 23S rRNA an der Position 2058 der 23S rRNA (Karlsson et al., 1999). Die verantwortliche Genvariante A2058T persistiert in den Stämmen bereits seit mindestens 20 Jahren, trotz des mittlerweile eingeführten Verbots von Tylosin als Leistungsförderer. Hieraus ergibt sich, dass diese Variante keinen Selektionsnachteil gegenüber sensiblen Stämmen zu besitzen scheint. Tylosin ist aber dennoch nicht verschwunden aus der Therapie, was den

Erhalt dieser Mutante in der Population ermöglicht haben könnte. Hidalgo et al. (2011) wiesen eine weitere Variante, A2058G, in 3 Feldisolaten nach, die zuvor für *B. hyodysenteriae* nur experimentell nach Passagierung von *B. hyodysenteriae*-Stämmen auf Selektivagar beschrieben war (Karlsson et al., 1999). In *Helicobacter pylori* war diese Mutation bereits mit einem erheblichen Selektionsnachteil in Verbindung gebracht worden (Björkholm et al., 2001). In *Mycobakterium smegmatis* wurden 2 weitere Mutationen in unmittelbarer Nähe (G2057A und C2611T) zu A2058G für den Ausgleich des Selektionsnachteils verantwortlich gemacht (Pfister et al., 2005). Die Daten von Hidalgo et al. (2011) bestätigen diesen Zusammenhang, da auch hier die 3 Mutationen nur in Kombination nachweisbar waren. In der vorliegenden Untersuchung konnte die A2058G Mutation lediglich einmal nachgewiesen werden und war dabei mit den zwei genannten Mutationen (G2057A und C2611T) assoziiert. Zudem hatte einer der in vorliegender Arbeit untersuchten 64 Stämme die ursprüngliche Variante A2058 und war erwartungsgemäß sensibel gegen Tylosin.

Für Tiamulin lagen die MHK-Werte der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten Stämme zu etwa 45 % im empfindlichen und zu 30 % im resistenten Bereich. Die übrigen waren intermediär. Gegen Valnemulin war keines der untersuchten Isolate resistent, 54 % waren sensibel und 46 % intermediär. Die MHK-Werte für Tiamulin und Valnemulin lagen im Vergleich zu anderen Arbeiten sehr hoch (Hidalgo et al., 2011; Karlsson et al., 2003; Lobová et al., 2004). Interessant war die 2-gipflige Verteilung der Stämme bezüglich ihrer MHK-Werte für beide Pleuromutiline. Da die Resistenz stufenweise entsteht, korrelieren die Anstiege der MHK-Werte wahrscheinlich mit resistenzinduzierenden Mutationen in Bindungsregionen (Böck et al., 1982; Drews et al., 1975; Karlsson et al., 2001). Eine Gruppierung von *B. hyodysenteriae* Isolaten mit MHK-Werten unterhalb von 0,5 µg/ml für Tiamulin wurde bereits von verschiedenen Autoren beschrieben. Sie vermuteten bereits erste resistenzinduzierende Veränderungen bei Stämmen mit einer MHK > 0,5 µg/ml und nahmen diesen Wert als Grenzwert für beginnend resistente Stämme an (Karlsson et al., 2003; Hidalgo et al., 2011). Anhand der eigenen waren Grenzwerte von  $\leq 0,625$  µg/ml für Tiamulin und unter 0,125 µg/ml für Valnemulin eher wahrscheinlich. Die Beobachtung, dass die Anstiege der Werte für beide Pleuromutiline parallel verliefen, ist wahrscheinlich auf den ähnlichen Wirkmechanismus zurückzuführen. Valnemulin besitzt eine längere Seitenkette als Tiamulin und kann daher mehrere hydrophobe Wechselwirkungen mit Nukleotiden der 23S rRNA eingehen. Damit hat Valnemulin eine stabilere Anlagerung am Ribosom und eine höhere Bindungsaffinität. Verschiedene Forschergruppen sprechen von einer Kreuzresistenz

zwischen den Pleuromutilinen, wobei die MHK-Werte von Valnemulin 1-2 Verdünnungsstufen unterhalb der von Tiamulin liegen (Hidalgo et al., 2011; Lobová et al., 2004). Für Valnemulin gibt es keine einheitlichen Grenzwerte zur Einteilung in sensibel, intermediär und resistent. In Deutschland werden die von der Fa. Novartis festgelegten Grenzwerte nach Höchstdosierung von Valnemulin (11,7 mg/kg) angenommen. In Dänemark wird Valnemulin zur Therapie der Dysenterie mit 3,8 mg/kg KGW eingesetzt. Dementsprechend werden völlig andere Grenzwerte zur Einteilung verwendet. Die Grenzwerte für die übrigen Antibiotika basieren auf pharmakokinetischen Daten und wurden 1990 von Rønne und Szancer etabliert. Diese Einteilungen bedürfen allerdings einer Aktualisierung und Standardisierung, da die Methoden zur Bestimmung der MHK-Werte nicht einheitlich sind. Gebräuchliche Agardilutionstests ergeben im Durchschnitt um eine Verdünnungsstufe höhere MHK-Werte als die mittlerweile etablierten Boulliondilutionstests (Kessler, 2001; Rohde et al., 2004). Die Autoren schlagen eine Anpassung der Grenzwerte an den durchgeführten Test vor. Die Arbeitsgruppe Antibiotikaresistenz der deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft erarbeitet derzeit ein Konzept zur Harmonisierung und Standardisierung der Methodik für die Empfindlichkeitsprüfung. Hierfür soll die Leitlinie des amerikanischen CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) etabliert werden. Die Methode der Wahl ist demnach der auch in der vorliegenden Untersuchung verwendete Mikrobouillondilutionstest. Weitere Ziele sind die Erarbeitung von Grenzwerten anhand von vorhandenem Datenmaterial (DIN; CLSI; relevante Publikationen).

Die MHK-Werte für Pleuromutiline zeigten im eigenen Untersuchungsmaterial deutliche Anstiege zwischen 1998 und 2002. Ein Zusammenhang des Anstiegs mit dem zeitgleichen Verbot des Einsatzes von Tylosin als Leistungsförderer (1999) in der Schweinemast ist wahrscheinlich.

Bereits 2004 untersuchten Pringle et al. Bindungsregionen der Pleuromutiline an einer kleinen Auswahl von *B. hyodysenteriae* Stämmen aus Schweden. Jeder Stamm, der durch mehrmalige Passagen auf Tiamulin-haltigem Agar resistent wurde, hatte entweder Mutationen in der Domäne V der 23S rRNA oder im ribosomalen Protein L3. Keine Kombination von Mutationen kam mehrmals vor. Die Hypothese des Zusammenhangs zwischen SNPs in der 23S rRNA und L3 und den MHK-Werten für die Pleuromutiline wurde auch von der spanischen Arbeitsgruppe aufgegriffen (Hidalgo et al., 2011). In 5 von 38 *B. hyodysenteriae*-Feldisolaten konnte neben der tylosinresistenz-bestimmenden Mutation an Position 2058 keine Mutation detektiert werden, die für eine Pleuromutilinresistenz verantwortlich wäre. Die Autoren folgerten daraus, dass weitere Genvarianten an der Resistenzentwicklung gegen

Pleuromutiline beteiligt sein müssen. Im eigenen Datenmaterial wurden sechs SNPs detektiert, die bereits von den genannten Autoren publiziert wurden (Hidalgo et al., 2011). Neben der Mutation A2058T in nahezu allen Stämmen waren die dominierenden Mutationen C2165G, T2202A und G2221T nachweisbar, die keine Assoziation zu MHK-Werten aufwiesen.

Eine Mutation an Position 2504, einem direkten Bindungspartner von Tiamulin, die in vitro mit hohen MHK-Werten assoziiert war, konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht nachgewiesen werden (Pringle et al., 2004). Die Mutation G2032A, die nahe der Tiamulin-Bindungsstelle liegt und in einem resistenten schwedischen und 40 % der resistenten spanischen Stämme vorkam, konnte in keinem deutschen Stamm nachgewiesen werden. Eine Mutation an Position 2535 wurde von Hidalgo et al. (2011) nachgewiesen. Aus vorangegangenen Studien (Treede et al., 2003) sind sowohl Methylierung als auch Mutation an der Position 2535 unter Einfluss des Leistungsförderers Avilamycin beschrieben. Hidalgo et al. (2011) mutmaßten, dass das Vorkommen dieser Mutation nicht durch den Einsatz von Pleuromutilinen, sondern durch einen vorangegangenen, Avilamycin-bedingten Selektionsdruck oder aufgrund des Einsatzes eines anderen Antibiotikums aus der Orthosomycin-Gruppe bedingt ist. Aus Großbritannien kommen Studien, die die Persistenz der Resistenz von Enterokokken gegenüber Avilamycin untersucht haben. Die resistenten Stämme waren innerhalb einer Woche nach Behandlungsende nicht mehr nachweisbar. Diese Resistenz bewirkt scheinbar einen starken Selektionsnachteil. Innerhalb kürzester Zeit nach Beendigung des Selektionsdrucks wurden die resistenten Stämme von der sensiblen Mikroflora verdrängt. In der vorliegenden Untersuchung wurde dieser SNP in 20 % der Isolate detektiert. Während in einem Tier vor der Tiamulin-Behandlung Stämme mit der Genvariante G2535 detektiert wurden, fanden sich im gleichen Tier 10 Tage nach Beendigung der Therapie Stämme mit der Variante G2535A, was die Vermutung nahelegt, dass auch eine Behandlung mit Tiamulin zur Herausselektion der G2535A Variante führen kann.

Die Variante G2535 hat in der vorliegenden Untersuchung einen um Faktor 3 höheren MHK-Median für Tiamulin als G2535A. Für Valnemulin liegt der MHK-Median der Variante G2535 sogar um den Faktor 10 höher. In anderen Studien konnte die A-Mutante auch mit niedrigeren MHK-Werten als die G-Mutante in Verbindung gebracht werden (Hidalgo et al., 2011). Dabei konnte jedoch kein Zusammenhang mit anderen vorkommenden SNPs hergestellt werden. In Kombination mit einem SNP im ribosomalen Protein L3, der zu einem

Aminosäureaustausch führt, zeigt der SNP an Position 2535 in der vorliegenden Untersuchung signifikante Assoziationen zu den MHK-Werten der Pleuromutiline.

Ein SNP im Gen des ribosomalen Proteins L3 (Nukleinsäure 443) liegt an der 2. Position eines Basentriplets und führt zum Aminosäureaustausch (Position 148 in der Aminosäuresequenz). Die Variation der Aminosäuren Asparagin und Serin war signifikant mit den MHK-Werten für Tiamulin und Valnemulin assoziiert. Pringle et al. (2004) und Hidalgo et al. (2011) konnten diesen SNP ebenfalls nachweisen, kommen jedoch zu teilweise kontroversen Ergebnissen. Die Autoren vermuteten durch einen Aminosäureaustausch eine Konformationsänderung innerhalb der Struktur des Proteins und dadurch eine indirekte Beeinflussung der Bindungsaffinität der Antibiotika. In den schwedischen Stämmen war Asparagin einmal durch Lysin ausgetauscht. Diese Variante konnte in den vorliegenden Stämmen nicht nachgewiesen werden. Von 13 schwedischen Isolaten war Serin 4-mal nachweisbar, davon einmal in einem Tiamulin sensiblen- (0,5 µg/ml) und dreimal in einem Tiamulin resistenten Stamm. In 3 gleichzeitig untersuchten Feldstämmen war Serin zweimal, einmal in einem sensiblen (0,5 µg/ml) und einmal in einem resistenten (16-32 µg/ml) Isolat detektierbar (Pringle et al., 2004). Hidalgo et al. (2011) fanden Serin in 4 von 38 Isolaten (11 %), einmal in einem Tiamulin resistenten (32 µg/ml) Stamm und dreimal in sensiblen (0,125 µg/ml) Stämmen. Die Ergebnisse von Hidalgo et al. (2011) stimmen damit weitgehend mit unseren Ergebnissen überein. Die Studie von Pringle et al. (2004) lässt hingegen aufgrund des geringen Vorkommens der Serin-Variante keinen validen Schluss zu.

Die MHK-Werte in den Asparagin-kodierten Stämmen zeigten eine deutliche Dissoziation. 50 % der Werte für Tiamulin lagen zwischen 0,156 µg/ml und 8 µg/ml, was impliziert, dass noch weitere Mechanismen für die Entstehung der Pleuromutilinresistenz verantwortlich sein müssen. Insgesamt konnte anhand dieses SNPs in 79 % der Fälle eine korrekte Zuordnung der Stämme ( $\text{MHK} \leq 0,625 \mu\text{g/ml}$  oder  $> 0,625 \mu\text{g/ml}$ ) vorgenommen werden.

Von Pringle et al. (2004) und Hidalgo et al. (2011) wurde außerdem ein weiterer Aminosäureaustausch an Position 149 der Aminosäuresequenz nachgewiesen. Während in einem resistenten Stamm ( $\text{MHK [Tiamulin]} = 64 \mu\text{g/ml}$ ) von Pringle et al. (2004) ein Serin durch Isoleucin ausgetauscht war, konnten Hidalgo et al. (2011) in 2 resistenten Stämmen (4 bzw. 8 µg/ml) den Austausch von Serin zu Threonin feststellen. Alle Stämme der vorliegenden Arbeit waren an Position 149 monomorph.

Die Kombination der relevanten SNPs in L3 und der 23S rRNA lieferte die folgenden Paarungen abnehmender Resistenz: Asn/G2535 > Asn/G2535A > Ser/ G2535. Durch die Kombination beider Varianten unterteilen sich die L3-Asn Stämme in die signifikant resistendere Gruppe Asn/G2535 und die entsprechend empfindlichere Kombination Asn/G2535A. Die empfindlichste Kombination war Ser/G2535. Eine in der vorliegenden Untersuchung nicht vorkommende Variante Ser/G2535A müsste damit theoretisch die niedrigsten MHK-Werte für die Pleuromutiline aufweisen. Diese Vermutung bestätigt sich in der Untersuchung von Hidalgo et al. (2011), die 3 sensible Stämme (0,125 µg/ml für Tiamulin und ≤0,031 µg/ml für Valnemulin) mit der Kombination Ser/G2535A beschrieben. Diese Genotypkombination wurde aber in keinem resistenten Stamm nachgewiesen.

Anhand des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Datenmaterials konnte zum ersten Mal ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen kombinierten Genvarianten der 23S rRNA und dem ribosomalen Protein L3 und den MHK-Werten für Pleuromutiline hergestellt werden.

Der Einfluss der Kombinationen auf die MHK-Werte von Tylosin lieferte ein weiteres interessantes Ergebnis. Für die Variante Asn/G2535, die über das gesamte Stammkollektiv mit den höchsten MHK-Werten für Pleuromutiline assoziiert war, konnten zugleich die niedrigsten MHK-Werte für Tylosin detektiert werden. Die Variante Asn/G2535 scheint eine Konformation des Peptidyltransferasezentrums zu begünstigen, die die Bindungsaffinität von Tylosin erhöht. Ein ähnliches Phänomen war bereits für eine Mutation an Position 2032 beschrieben. Während die Mutante eine Resistenz gegen Lincosamide bedingt, führt sie gleichzeitig zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber Erythromycin (Douthwaite, 1992).

Der Einfluss einer Tiamulin-Behandlung auf die MHK-Entwicklung in einer an Dysenterie erkrankten Herde wurde anhand mehrerer Stämme getestet. Alle Stämme waren schon vor Behandlungsbeginn resistent gegen Tylosin. Die MHK-Werte für Lincomycin stiegen für nahezu alle Stämme, ausgehend von einem intermediären Level, durch die Therapie in den hoch-resistenten Bereich. Am deutlichsten jedoch war der Behandlungseffekt bei Tiamulin. Während die MHK-Werte vor der Therapie durchweg im empfindlichen Bereich lagen, konnten nach Behandlung nur noch hoch-resistente Werte festgestellt werden. Parallel mit der Entwicklung der MHK-Werte kam es auch zur Umverteilung der Genvarianten. Die vorgefundene 3-tägige parenterale Tiamulinverabreichung und zusätzliche 10-tägige Karenzzeit entsprach nicht der praxisüblichen Behandlung. Es zeigte sich jedoch, dass die

kurze Behandlungszeit von 3 Tagen ausreichte, um die Ausbreitung der resistenten Genvariante zu begünstigen. Auch 10 anschließende, behandlungsfreie Tage hatten keine erneute Verdrängung dieser Genvariante zur Folge. Es bleibt allerdings unklar, ob die Genvariante durch Spontanmutation entstanden war oder durch den Selektionsvorteil bereits vor Behandlungsbeginn resistenter Stämme in der Herde.

### **Fazit**

Die vorliegende Arbeit identifiziert zwei Varianten in am Aufbau des Ribosoms beteiligten Genen, deren Kombination signifikant zur Variabilität der Empfindlichkeit/Resistenz der untersuchten 64 *B. hyodysenteriae* Stämme beiträgt. Die Verteilung der MHK-Werte der Stämme weist auf einen Grenzwert von 0,625 µg Tiamulin/ml hin. Durch gleichzeitige Berücksichtigung der varianten Positionen 2535 der 23S rRNA und 443 des ribosomalen Proteins L3 konnte die Resistenzlage von 82 % der untersuchten Stämme korrekt prognostiziert werden. Mutationen der 23S rRNA können bei Bakterien wie Brachyspiren, die lediglich ein RNA Operon besitzen, direkt resistenzinduzierend wirken. Mutationen in der DNA der ribosomalen Proteine haben nur dann einen Einfluss auf die Bindungsaffinität der Antibiotika, wenn sie mit einem Aminosäureaustausch einhergehen, der zu Ladungsumverteilungen oder Konformationsänderungen führt. Die Kombination solcher Varianten könnte für die bekannte, stufenweise Resistenzentwicklung verantwortlich sein. Die nicht-prognostizierbaren Stämme, der Vergleich mit anderen Studien und die Variabilität der Gesamtheit der bislang untersuchten Stämme sprechen dafür, dass das jeweilige Resistenzergebnis eines Stammes als Summe der Interaktionen einer Vielzahl verschiedener Genvarianten zustande kommt. Moderne Hochdurchsatz-Sequenzieretechniken werden die Resistenzdiagnostik in die Lage versetzen, auch solche komplexe Interaktionen von Genen und Genvarianten zu nutzen. Hierfür müssen jedoch zunächst die beteiligten Genvarianten identifiziert werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierten Assoziationen zwischen Genvarianten der 23S rRNA und des ribosomalen Proteins L3 und MHK-Werten stellen einen Beitrag zur Identifikation solcher Gene und Genvarianten dar.

## 6 Zusammenfassung

*Brachyspira hyodysenteriae* ist der Erreger der Schweinedysenterie, einer weltweit vorkommenden Durchfallerkrankung bei Mastschweinen, die zu schwerer mucohämorrhagischer Colitis und Typhlis führt. Im Falle eines Krankheitsausbruchs sind erhebliche ökonomischen Einbußen durch reduzierte Futterverwertung und Tageszunahmen zu erwarten, zudem ist mit hohen Totalverlusten zu rechnen, weshalb eine umgehende Behandlung unabdingbar ist.

Mit hoch sensitiven und spezifischen diagnostischen Verfahren – wie der PCR – kann binnen eines Tages die Diagnose gestellt werden. Ein Resistenztest – der nach guter veterinärmedizinischer Praxis der Therapie voransteht – ist aktuell nur über eine relativ langwierige bakteriologische Anzucht möglich. Außerdem steht der Resistenztest für *B. hyodysenteriae* nicht flächendeckend zur Verfügung.

Zudem werden steigende Resistenzraten gegen die derzeit effektivste Wirkstoffgruppe zur Behandlung der Dysenterie – die Pleuromutiline – beobachtet.

In der vorliegenden Dissertation wurden 64 *B. hyodysenteriae*-Stämme aus deutschen Betrieben auf Mutationen mit Assoziation zu den MHK-Werten für Pleuromutiline, Makrolide und Lincosamide untersucht. Das Stammkollektiv wurde auf Tryptikase-Soja-Agar mit 5% Schafblutzusatz und 5 Selektivantibiotika angezüchtet und reinkultiviert. Anschließend wurden die MHK-Werte mit einem Mikroboulliondilutionstest (MBDT) bestimmt. Mittels PCR wurden Gene, die für Bindungsregionen der Pleuromutiline in der 23S rRNA kodieren, sowie Gene für Proteine, die unmittelbar an das Peptidyltransferasezentrum angrenzen (L3, L4, L2, L22), amplifiziert. Die Amplifikate wurden sequenziert. Durch vergleichende Analysen konnten Mutationen detektiert und Assoziationen zu MHK-Werten hergestellt werden. Von insgesamt 14 SNPs in der 23S rRNA und 4 SNPs in L3 waren 2 SNPs (L3<sub>443</sub> in L3 und Position 2535 in der 23S rRNA) signifikant mit den MHK-Werten assoziiert. Der SNP in L3 an Position 443 führte in 27 % der Fälle zu einem Aminosäureaustausch von Asparagin (Asn) zu Serin (Ser). Dieser Austausch war signifikant mit den MHK-Werten für Tiamulin ( $p=0.002$ ) und den MHK-Werten für Valnemulin ( $p=0.004$ ) assoziiert. 73 % der L3<sub>443</sub>-Asparagin-Stämme wiesen einen MHK-Wert unterhalb von 0,625 µg/ml für Tiamulin auf. 89 % der L3<sub>443</sub>-Serin-Stämme erreichten MHK-Werte oberhalb von 0,625 µg/ml. Unter Einbeziehung des SNPs an Position 2535 der 23S rRNA, der in den Varianten G2535 und G2535A vorkam, ergaben sich vier Varianten, von denen drei



nachgewiesen werden konnten: Asn/G2535, Asn/G2535A und Ser/G2535. Innerhalb des vorliegenden Stammkollektivs ergab sich allerdings keine weitere Aufspaltung der L3-Ser Variante. Mit der Aufspaltung der L3-Asn Variante in Asn/G2535 und Asn/G2535A, konnte hingegen ein Anteil der unerwartet sensiblen Stämme durch die offensichtlich MHK-absenkende Wirkung der G2535A Variante erklärt werden. Hierdurch stieg die korrekte Zuordnung der Stämme innerhalb der L3-Asn Gruppe von 73 % auf 79 % an. Innerhalb der G2535 Stämme konnte damit die Aussagekraft durch Einbeziehung der L3-SNPs von 77 % auf 82 % gesteigert werden. Die vierte nicht vorkommende, Variante Ser/G2535A wurde in einer spanischen Untersuchung in 3 von 18 gegen Tiamulin und Valnemulin hoch-sensiblen Stämmen nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand der 64 untersuchten *B. hyodysenteriae*-Stämme erstmalig ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen kombinierten Genvarianten der 23S rRNA und dem ribosomalen Protein L3 und den MHK-Werten für Pleuromutiline hergestellt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse stehen damit für die Entwicklung neuer molekularer Resistenztests zur Verfügung.

## 7 Summary

*B. hyodysenteriae* is the pathogenic agent of swine dysentery, a disease characterized by mucohaemorrhagic colitis and typhlitis. The disease is spread worldwide. In case of an outbreak, economic efficiency is reduced because of decreased daily weight gain, poor feed conversion, treatment expenses and increased mortality. Immediate treatment is essential.

Highly sensitive and specific methods like PCR facilitate diagnostics within one day. Good veterinary practice requires resistance testing prior to treatment, which is still based on the time-consuming and elaborative cultivation of isolates, and not generally part of routine diagnostics. At the same time, the resistance of *B. hyodysenteriae* to the most effective drug class for the treatment of dysentery - the pleuromutilins – is significantly increasing.

The present thesis examined 64 German *B. hyodysenteriae* field strains for mutations of ribosomal RNA and proteins and associations with corresponding MIC values of the strains for pleuromutilins. Cultivation was done on trypticase soy agar with 5% sheep blood and 5 selective antibiotics. MIC values were determined using a micro bouillon dilution test (MBDT). Genes involved in binding regions of pleuromutilins in the peptidyl transferase center (23S rRNA, L3, L4, L2, L22) were amplified by PCR and sequenced. From a total of 14 SNPs in the 23S rRNA and 4 SNPs in L3, 2 SNPs (L3<sub>443</sub> in L3 and SNP<sub>2535</sub> in the 23S rRNA) were significantly associated with MIC values. The SNP in L3 at position 443 resulted in amino acid substitution of asparagine (Asn; 73% of isolates) to serine (Ser; 27% of isolates). This variability was significantly associated with MIC values of tiamulin ( $p = 0,002$ ) and valnemulin ( $p = 0,004$ ). 73% of the asparagine-L3<sub>443</sub> strains showed MIC values less than 0.625 µg/ml for tiamulin. 89 % of the serine strains reached MIC values higher than 0.625 µg/ml. The combination of SNPs at position 2535 of 23S rRNA and L3<sub>443</sub> resulted in four variants, three of which were found in the present batch of isolates: Asn/G2535, Asn/G2535A and Ser/G2535. Subdividing the L3-Asn variant into Asn/G2535 and Asn/G2535A led to an improved explanation of sensitive strains among this generally resistant group of strains, pointing out the MIC-decreasing effect of the G2535A variant. Thus, the correct assignment of L3-Asn strains grew from 73% to 79%. At the same time, the corresponding assignment of G2535 strains grew from 77% to 82%. The fourth variant, Ser/G2535A, was not found in the present study. It was, however detected in a Spanish study in 3 of 18 strains, highly sensitive to tiamulin and valnemulin.

---

Based on 64 *B. hyodysenteriae* field strains, the present study identified significant associations between two combined SNPs (SNP<sub>2535</sub> of 23S rRNA and SNP<sub>443</sub> of the ribosomal protein L3) and the MICs of Pleuromutilins. These results might contribute to future molecular testing for resistance in *B. hyodysenteriae*.

## 8 Literaturverzeichnis

- Achacha, M. und S. Messier.** 1992. Comparison of six different culture media for isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 30: 249-251.
- Altreuther, P., A. Bottner, M. Scheer, P. Schmid, W. Traeder und S. Weiskopf.** 1997. Anmerkungen zum Resistenzmonitoring in der Tiergesundheit. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 110: 418-421.
- Andersson, D. I. und D. Hughes.** 2010. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat. Rev. Microbiol. 8(4): 260–271.
- Argenzio, R. A., S. C. Whipp und R. D. Glock.** 1980. Pathophysiology of swine dysentery: Colonic transport and permeability studies. J. Infect. Dis. 142: 676–684.
- Ban, N., P. Nissen, J. Hansen, P. B. Moore und T. A. Steitz.** 2000. The complete atomic structure of the large ribosomal subunit at 2.4 Å resolution. Science. 289(5481): 905–920.
- Barcellos, D. E., M. R. Mathiesen, M. de Uzeda, I. Kader und G. E. Duhamel.** 2000. Prevalence of *Brachyspira* species isolated from diarrhoeic pigs in Brazil. Vet. Rec. 146: 398-403.
- Bellgard, M. I., P. Wanchanthuek, T. La, K. Ryan, P. Moolhuijzen, Z. Albertyn, B. Shaban, Y. Motro, D. S. Dunn, D. Schibeci, A. Hunter, R. Barrero, N. D. Phillips und D. J. Hampson.** 2009. Genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira hyodysenteriae* reveals adaptations to its lifestyle in the porcine large intestine. PLoS ONE. 4(3): e4641.
- Biksi I., M. Lőrincz, B. Molnar, T. Kecskes, N. Takacs, D. Mirt, A. Cizek, Z. Pejsak, G. P. Martineau, J. L. Sevin und O. Szenci.** 2007. Prevalence of selected enteropathogenic bacteria in Hungarian finishing pigs. Acta Vet. Hung. 55: 219-227.
- Binek, M. und Z. M. Szykiewicz.** 1984. Physiological properties and classification of strains of *Treponema* sp. isolated from pigs in Poland. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 7: 141-148.
- Björkholm, B., M. Sjölund, P. G. Falk, O. G. Berg, L. Engstrand und D. I. Andersson.** 2001. Mutation frequency and biological cost of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*. Proc Natl Acad Sci USA. 98(25): 14607–14612.
- Böck, A., F. Turnowsky und G. Högenauer.** 1982. Tiamulin resistance mutations in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 151(3): 1253-1260.
- Bøsling, J., S. M. Poulsen, B. Vester und K. S. Long.** 2003. Resistance to the peptidyl transferase inhibitor tiamulin caused by mutation of ribosomal protein L3. Antimicrob. Agents Chemother. 47: 2892-2896.

- Böttner, A., A. de Jong, P. Schmid, S. Schüller, W. Traeder und S. Weiskopf.** 2000. Zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (breakpoints) für veterinärmedizinisch relevante Antibiotika zur Resistenzbeurteilung bei tierpathogenen Erregern. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 113: 344–347.
- Boye, M., S. B. Baloda, T. D. Leser und K. Moller.** 2001. Survival of *Brachyspira hyodysenteriae* and *B. pilosicoli* in terrestrial microcosms. Vet. Microbiol. 81: 33-40.
- Calderaro, A., S. Bommezzadri, G. Piccolo, C. Zuelli, G. Dettori und C. Chezzi.** 2005. Rapid isolation of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* from pigs. Vet. Microbiol. 105: 229-234.
- Carvajal A., M. L. De Arriba, H. Rodriguez, A. B. Vidal, G. E. Duhamel und P. Rubio.** 2006. Prevalence of *Brachyspira species* in pigs with diarrhoea in Spain. Vet. Rec. 158: 700-701.
- Chittum, H. S. und W. S. Champney.** 1994. Ribosomal protein gene sequence changes in erythromycin-resistant mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176:6192–6198.
- Davis, A. J., S. C. Smith und R. J. Moore.** 2005. The *Brachyspira hyodysenteriae* ftnA gene: DNA vaccination and real-time PCR quantification of bacteria in a mouse model of disease. Curr. Microbiol. 50: 285-291.
- Delsol, A. A., L. Randall, S. Cooles, M. J. Woodward, J. Sunderland und J. M. Roe.** 2005. Effect of the growth promoter avilamycin on emergence and persistence of antimicrobial resistance in enteric bacteria in the pig. J. Appl. Microbiol. 98(3):564-71.
- Demuth, D. C. und C. R. Müntener.** 2008. Tierarzneimittelkompendium der Schweiz 2008/2009. Tierarzneim-Kompend. Schweiz 8: 1-776.
- Drews, J., A. Georgopoulos, G. Laber, E. Schütze und J. Unger.** 1975. Antimicrobial activities of 81.723 hfu, a new pleuromutilin derivative. Antimicrob. Agents Chemother. 7(5): 507-516.
- Douthwaite, S.** 1992. Functional interactions within 23S rRNA involving the peptidyltransferase center. J Bacteriol. 174(4): 1333–1338.
- Duhamel, G. E., und L. A. Joens.** 1994. Laboratory procedures for diagnosis of swine dysentery. Am. Assoc. of Vet. Lab. Diag., Madison, Wisconsin, USA.
- Elder, R. O., G. E. Duhamel, R. W. Schafer, M. R. Mathiesen und M. Ramanathan.** 1994. Rapid detection of *Serpulina hyodysenteriae* in diagnostic specimens by PCR. J. Clin. Microbiol. 32: 1497-1502.
- Fellström, C., B. Pettersson, J. Thomson, A. Gunnarsson, M. Persson und K. E. Johansson.** 1997. Identification of *Serpulina* species associated with porcine colitis by biochemical analysis and PCR. J. Clin. Microbiol. 35: 462-467.

- Fellström, C., M. Karlsson, B. Pettersson, U. Zimmerman, A. Gunnarsson und A. Aspan.** 1999. Emended descriptions of indole negative and indole positive isolates of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. 70: 225-238.
- Feltrup, C., J. Verspohl und G. Amtsberg.** 1999. Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochatendiarrhoe. 1. Mitteilung: Kulturell-biochemische Differenzierung intestinaler Serpulinen in der Routinediagnostik. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 106: 200-207.
- Fossi, M., T. Saranpää und E. Rautiainen.** 1999. In vitro susceptibility of the swine *Brachyspira* species to tiamulin in Finland 1995-1997. Acta Vet. Scand. 40: 355-358
- Furneri, P. M. und G. Nicoletti.** 1991. Macrolides: present and future. An appraisal of *invitro* activity and pharmacokinetic behavior. J. Chemother. 3 Suppl. 1: 24-27.
- Gaynor, M. und A. S. Mankin.** 2003. Macrolide Antibiotics: Binding Site, Mechanism of Action, Resistance. Curr. Top. Med. Chem. 3: 949-960.
- Glock, R. D., D. L. Harris und J. P. Kluge.** 1974. Localization of spirochetes with the structural characteristics of *Treponema hyodysenteriae* in the lesions of swine dysentery. Infect. Immun. 9: 167-178.
- Glock, R. D., K. J. Vanderloo und J. M. Kinyon.** 1975. Survival of certain pathogenic organisms in swine lagoon effluent. J. Am. Vet. Med. Assoc. 166: 277-278.
- Guerra, B., E. Junker, A. Schroeter, B. Malorny, S. Lehmann und R. Helmuth.** 2003. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. J. Antimicrob. Chemother. 52(3): 489-92.
- Halter, M. R. und L. A. Joens.** 1988. Lipooligosaccharides from *Treponema hyodysenteriae* and *Treponema innocens*. Infect. Immun. 56:3152-3156.
- Hampson, D. J., R. F. Atyeo und B. G. Combs.** 1997. Swine dysentery. in: Intestinal spirochaetes in domestic animals and humans. Hampson, D. J. und T. B. Stanton (Hrsg.). 175-209. Wallingford, England: CAB International.
- Hampson, D. J. und T. La.** 2006. Proposed revisions to the nomenclature for *Brachyspira* membrane proteins and lipoproteins. Microbiology. 152 (1): 1-2.
- Hampson, D. J., C. Fellström und U. J. Thomson.** 2006. Swine dysentery. in: B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'allaire U. D. J. Taylor (Hrsg.): Diseases of Swine. 9<sup>th</sup> ed., Blackwell Publishing Ltd, Ames, Iowa, S. 785-805.
- Hampson, D. J.** 2012. Brachyspiral Colitis. In: Diseases of Swine. J. J. Zimmerman, L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz (Hrsg.). 10<sup>th</sup> Edition, John Wiley & Sons, Ltd., West Sussex, UK.S. 680-696.

- Harvey, R. B., T. S. Edrington, L. F. Kubena, D. E. Corrier und M. H. Elissalde.** 1995. Influence of the antibiotics lincomycin and tylosin on aflatoxicosis when added to aflatoxin-contaminated diets of growing swine. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7(3): 374-379.
- Herbst, W., H. Willems und G. Baljer.** 2004. Verbreitung von *Brachyspira hyodysenteriae* und *Lawsonia intracellularis* bei gesunden und durchfallkranken Schweinen. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 117: 493-498.
- Hidalgo, A., A. Carvajal, C. García-Feliz, J. Osorio und P. Rubio.** 2009. Antimicrobial susceptibility testing of Spanish field isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *Res. Vet. Sci.* 87: 7-12.
- Hidalgo, A., A. Carvajal, M. Pringle, P. Rubio und C. Fellström.** 2010. Characterization and epidemiological relationships of Spanish *Brachyspira hyodysenteriae* field isolates. *Epidemiol. Infect.* 138: 76-85.
- Hidalgo A., A. Carvajal, B. Vester, M. Pringle, G. Naharro und P. Rubio.** 2011. Trends towards Lower Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Acquired Resistance among Clinical Isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55(7): 3330–3337.
- Homme, J., F. Castryck, F. Haesebrouck und L. A. Devriese.** 1998. Identification of porcine *Serpulina* strains in routine diagnostic bacteriology. *Vet. Microbiol.* 62: 163-169.
- Hsu T., D.L. Hutto und F.C. Minion.** 2001. Cloning of a beta-haemolysin gene of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* and its expression in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 69: 706-711
- Hughes R., H. J. Olander, D. L. Kanitz und S. Qureshi.** 1977. A study of swine dysentery by immunofluorescence and histology. *Vet. Pathol.* 14: 490–507.
- Humphrey S. B., T. B. Stanton, N. S. Jensen und R. L. Zuerner.** 1997. Purification and characterization of VSH-1, a generalized transducing bacteriophage of *Serpulina hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.* 179: 323–329.
- Hutto D.L. und M.J. Wannemuehler.** 1999. A comparison of the morphologic effects of *Serpulina hyodysenteriae* or its beta-hemolysin on the murine mucosa. *Vet. Pathol.* 36: 412–422.
- Hyatt D. R., A. A. Ter Huurne, B. A. Van Der Zeist und L. A. Joens.** 1994. Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain. *Infect. Immun.* 62: 2244–2248.
- Jenkinson, S. R., und C. R. Wingar.** 1981. Selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. *Vet. Rec.* 109: 384-385.

- Joens L. A., R. D. Glock, S. C. Whipp, I. M. Robinson und D. L. Harris.** 1981. Location of *Treponema hyodysenteriae* and synergistic anaerobic bacteria in colonic lesions on gnotobiotic pigs. *Vet. Microbiol.* 6: 69–77.
- Joens, L. A. und J. M. Kinyon.** 1982. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from wild rodents. *J. Clin. Microbiol.* 15: 994–997.
- Kahlmeter G., D. F. J. Brown, F. W. Goldstein, A. P. MacGowan, J. W. Mouton, A. Osterlund, A. Rodloff, M. Steinbakk, P. Urbaskova und A. Vatopoulos.** 2003. European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 52(2): 145–148.
- Karlsson, M., C. Fellström, M. U. Heldtander, K. E. Johansson und A. Franklin.** 1999. Genetic basis of macrolide and lincosamide resistance in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 172: 255–260.
- Karlsson, M., A. Gunnarsson und A. Franklin.** 2001. Susceptibility to pleuromutilins in *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*. *Anim. Health Res. Rev.* 2: 59–65.
- Karlsson, M., S. L. Oxberry und D. J. Hampson.** 2002. Antimicrobial susceptibility testing of Australian isolates of *Brachyspira hyodysenteriae* using a new broth dilution method. *Vet. Microbiol.* 84: 123–133.
- Karlsson, M., C. Fellström, A. Gunnarsson, A. Landén und A. Franklin.** 2003. Antimicrobial susceptibility testing of porcine *Brachyspira (Serpulina)* species isolates. *J. Clin. Microbiol.* 41: 2596–2604.
- Karlsson, M., A. Aspán, A. Landén und A. Franklin.** 2004. Further characterization of porcine *Brachyspira hyodysenteriae* isolates with decreased susceptibility to tiamulin. *J. Med. Microbiol.* 53: 281–285.
- Kataja, J., P. Huovinen, M. Skurnik und H. Seppälä.** 1999. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 48–52.
- Kessler, C.** 2001. Resistenzprüfung von *Brachyspira hyodysenteriae* gegenüber Tiamulin und Valnemulin mit dem Agardilutions- und Bouillondilutionstest. Diss. med. vet. Aus dem Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Kietzmann, M., A. Bottner, H. M. Hafez, C. Kehrenberg, D. Klarmann, P. Krabisch, T. Kuhn, G. Luhofer, A. Richter, S. Schwarz, W. Traeder, K. H. Waldmann, J. Wallmann und C. Werckenthin.** 2004. Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Überlegungen zur Festlegung von Grenzwertkonzentrationen (breakpoints) aus klinisch-pharmakologischer Sicht. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 117: 81–87.
- Kinyon, J. M., D. L. Harris und R. D. Glock.** 1977. Enteropathogenicity of various isolates of *Treponema hyodysenteriae*. *Infect. Immun.* 15: 638–646.



- Kinyon, J. M., D. L. Harris, und R. D. Glock** 1980. Isolation of *Treponema hyodysenteriae* from experimentally infected pigs at various intervals post-inoculation. In: Proc 6<sup>th</sup> Congr Int Pig Vet. Soc. 232.
- Kolbert, M. und P. M. Shah.** 2002. Diffusion oder Dilution: Antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung im Routinelabor. J. Lab. Med. 26: 420-424.
- Kroker, R., R. Scherkl und F. R. Ungemach.** 2002. Chemotherapie bakterieller Infektionen. In: H.-H. Frey, W. Löscher (Hrsg.). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin. Enke Verlag, Stuttgart 2. Auflage, S. 353 – 393.
- Kruse, R., B. Essen-Gustavsson, C. Fossum und M. Jensen-Waern.** 2008. Blood concentrations of the cytokines IL-1beta, IL-6, IL-10, TNF-alpha and IFN-gamma during experimentally induced swine dysentery. Acta Vet. Scand. 50: 32.
- Kunkle, R. A. und J. M. Kinyon.** 1988. Improved selective medium for the isolation of *Treponema hyodysenteriae*. J. Clin. Microbiol. 26: 2357-2360.
- La, T., N. D. Phillips und D. J. Hampson.** 2003. Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces. J. Clin. Microbiol. 41: 3372-3375.
- La, T., N. D. Phillips, M. P. Reichel und D. J. Hampson.** 2004. Protection of pigs from swine dysentery by vaccination with recombinant BmpB, a 29.7 kDa outer-membrane lipoprotein of *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. 102(1-2): 97–109.
- La, T., A. M. Collins, N. D. Phillips, A. Oksa und D. J. Hampson.** 2006. Development of a multiplex-PCR for rapid detection of the enteric pathogens *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* in porcine faeces. Lett. Appl. Microbiol. 42: 284-288.
- La, T., N. D. Phillips, B. L. Harland, P. Wanchanthuek, M. I. Bellgard und D. J. Hampson.** 2009. Multilocus sequence typing as a tool for studying the molecular epidemiology and population structure of *Brachyspira hyodysenteriae*. Vet. Microbiol. 138: 330-338.
- La, T., N. D. Phillips, P. Wanchanthuek, M. I. Bellgard, A. J. O'Hara und D. J. Hampson.** 2011. Evidence that the 36kb plasmid of *Brachyspira hyodysenteriae* contributes to virulence. Vet. Microbiol. 153 (1-2): 150-155.
- Lai, C. J. und B. Weisblum.** 1971. Altered methylation of ribosomal RNA in an erythromycin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 68: 856–860.
- LaMarre, J. M., J. B. Locke, K. J. Shaw und A. S. Mankin.** 2011. Low fitness cost of the multidrug resistance gene *cftr*. Antimicrob. Agents Chemother. 55: 3714–3719.
- Lee, J. I. und D. J. Hampson.** 1994. Genetic characterisation of intestinal spirochaetes and their association with disease. J. Med. Microbiol. 40: 365–371.

- Lee, B. J., T. La, A. S. J. Mikosza und D. J. Hampson.** 2000. Identification of the gene encoding BmpB, a 30 kDa outer envelope lipoprotein of *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae* and immunogenicity of recombinant BmpB in mice and pigs. *Vet. Microbiol.* 76: 245–257.
- Li, B. B., J. Z. Shen, X. Y. Cao, Y. Wang, L. Dai, S. Y. Huang und C.M. Wu.** 2010. Mutations in 23S rRNA gene associated with decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin in *Mycoplasma gallisepticum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 308(2): 144–149.
- Lobová, D., J. Smola und A. Cizek.** 2004. Decreased susceptibility to tiamulin and valnemulin among Czech isolates of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J. Med. Microbiol.* 53: 287–291.
- Long, K. S., J. Poehlsgaard, C. Kehrenberg, S. Schwarz und B. Vester.** 2006. The Cfr rRNA methyltransferase confers resistance to Phenicol, Lincosamides, Oxazolidinones, Pleuromutilins, and Streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(7): 2500–2505.
- Long, K. S., J. Poehlsgaard, L. H. Hansen, S. N. Hobbie, E. C. Böttger und B. Vester.** 2009. Single 23S rRNA mutations at the ribosomal peptidyl transferase centre confer resistance to valnemulin and other antibiotics in *Mycobacterium smegmatis* by perturbation of the drug binding pocket. *Mol. Microbiol.* 71(5): 1218–1227.
- Lucier, T. S., K. Heitzman, S. K. Liu und P. C. Hu.** 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2770–2773.
- Matson, E. G., M. G. Thompson, S. B. Humphrey, R. L. Zuerner und T. B. Stanton.** 2005. Identification of genes of VSH-1, a prophage-like gene transfer agent of *Brachyspira hyodysenteriae*. *J. Bacteriol.* 187: 5885–92.
- Mazzei, T., E. Mini, A. Novelli und P. Periti.** 1993. Chemistry and mode of action of macrolides. *J. Antimicrob. Chemother.* 31 Suppl C: 1–9.
- McOrist, S.** 2010. Dysentery and ileitis – High time to tackle the difficult science behind these diseases. *Proceedings of the 21st IPVS Congress, Vancouver, Canada: LS.8.*
- Molnár, L.** 1996. Sensitivity of strains of *Serpulina hyodysenteriae* isolated in Hungary to chemotherapeutic drugs. *Vet. Rec.* 138: 158–160.
- Motro, Y., T. La, M. Bellgard, D. S. Dunn, N. D. Phillips und D. J. Hampson.** 2009. Identification of genes associated with prophage-like gene transfer agents in the pathogenic intestinal spirochaetes *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Brachyspira intermedia*. *Vet. Microbiol.* 134 (3–4): 340–345.
- Nathues, H., C. J. B. Oliveira, M. Wurm, E. Grosse Beilage, und P. E. N. Givisiez.** 2007. Simultaneous detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in porcine faeces and tissue samples by multiplex-PCR. *J. Vet. Med.* 54: 532–538.

- Nissen, P., J. Hansen, N. Ban, P. B. Moore und T. A. Steitz.** 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289: 920–930.
- Novotná, M., und O. Skardová.** 2002. *Brachyspira hyodysenteriae*: detection, identification and antibiotic susceptibility. *Vet. Med. – Czech* 47(4): 104-10.
- Ochiai, S., Y. Adachi und K. Mori.** 1997. Unification of the genera *Serpulina* and *Brachyspira*, and proposals of *Brachyspira hyodysenteriae* Comb. Nov., *Brachyspira innocens* Comb. Nov. and *Brachyspira pilosicoli* Comb. Nov. *Microbiol. Immunol.* 41: 445-452.
- Oxberry, S. L. und D. J. Hampson.** 1998. Comparative in vitro sensitivity of *Serpulina hyodysenteriae* and *Serpulina pilosicoli* isolates to six antimicrobials. In: *Proceedings of the 15<sup>th</sup> Congr. Int. Pig Vet. Soc. Birmingham.* 132.
- Palka-Santini, M., E. Cleven, L. Eichinger, M. Krönke und O. Krut.** 2009. Large scale multiplex PCR improves pathogen detection by DNA microarrays. *BMC Microbiol.* 3;9:1.
- Pardo, D. und R. Rosset.** 1977. Properties of ribosomes from erythromycin resistant mutants of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 156: 267–271.
- Pfister P., N. Corti, S. Hobbie, C. Bruell, R. Zarivach, A. Yonath und E. C. Böttger.** 2005. 23S rRNA base pair 2057–2611 determines ketolide susceptibility and fitness cost of the macrolide resistance mutation 2058A→G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(14): 5180–5185.
- Phillips, N.D., T. La, P. J. Adams, B. L. Harland, S. G. Fenwyck und D. J. Hampson.** 2009. Detection of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira pilosicoli* in feral pigs. *Vet. Microbiol.* 134: 294–299.
- Plawinska, J., T. Jakubowski, M. Rzewuska und M. Binek.** 2004. Occurrence of *Lawsonia intracellularis* and *Brachyspira* spp. Infection in swine suffering from diarrhea. In: *Proceedings of the 18<sup>th</sup> Congr. Int. Pig Vet. Soc.* 287.
- Pohlenz, J. F., S. C. Whipp und I. M. Robinson.** 1983. Pathogenesis of swine dysentery caused by *Treponema hyodysenteriae*. *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.* 90: 363-367.
- Poulsen, S. M., M. Karlsson, L. B. Johansson und B. Vester.** 2001. The pleuromutilin drugs tiamulin and valnemulin bind to the RNA at the peptidyl transferase centre on the ribosome. *Mol. Microbiol.* 41: 1091–1099.
- Pringle, M., J. Poehlsgaard, B. Vester und K. S. Long.** 2004. Mutations in ribosomal protein L3 and 23S ribosomal RNA at the peptidyl transferase centre are associated with reduced susceptibility to tiamulin in *Brachyspira* spp. isolates. *Mol. Microbiol.* 54: 1295-1306.

- Råsbäck, T., C. Fellström, B. Bergsjö, A. Cizek, K. Collin, A. Gunnarsson, S. M. Jensen, A. Mars, J. Thomson, P. Vyt und M. Pringle.** 2005. Assessment of diagnostics and antimicrobial susceptibility testing of *Brachyspira* species using a ring test. *Vet. Microbiol.* 109: 229-243.
- Råsbäck, T., K. E. Johansson, D. S. Jansson, C. Fellström, M. Y. Alikhani, T. La, D. S. Dunn und D. J. Hampson.** 2007. Development of a multilocus sequence typing scheme for intestinal spirochaetes within the genus *Brachyspira*. *Microbiology* 153: 4074-4087.
- Reiner, G., S. Hillen, S. von Berg, M. Kixmöller und H. Willems.** 2011a. Analysis of bacterial load and prevalence of mixed infections with *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and/or *Brachyspira pilosicoli* in German pigs with diarrhoea. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 124(5-6): 236-41.
- Reiner, G., M. Winkelmann und H. Willems.** 2011b. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae*, and *Brachyspira pilosicoli* infection in hunted wild boars (*Sus scrofa*) in Germany. *Eur. J. Wildl. Res.* 57: 443-448.
- Richter, M., G. Baljer und W. Herbst.** 2008. Untersuchungen zur Adhäsion von *Brachyspira hyodysenteriae* an Darmepithelzellen von Schwein, Ratte und Mensch. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 121(11-12): 402.
- Ritzmann, M., A. Palzer, J. Verspohl, S. Baier, J. Schulte-Wülwer, H. Nienhoff, J. Harlizius, W. Schulte-Grotthoff und J. Rohde.** 2009. Deutschlandweites Monitoring zum Nachweis von *Brachyspira*-Species aus Durchfallproben vom Schwein und zur Sensitivität von *Brachyspira hyodysenteriae* sowie anderer *Brachyspira*-Species gegenüber Tiamulin. *Der Praktische Tierarzt* 90: 467-476.
- Rocks, A.** 2005. Untersuchung zur Implementierung des Bouillon - Mikrodilutionsverfahrens zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. *Diss. Med. Vet.* Aus dem Institut für Mikrobiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- Rohde, J., A. Rothkamp und G. F. Gerlach.** 2002. Differentiation of porcine *Brachyspira* species by a novel *nox* PCR-based restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 40: 2598-2600.
- Rohde, J., M. Kessler, C. G. Baums und G. Amtsberg.** 2004. Comparison of methods for antimicrobial susceptibility testing and MIC values for pleuromutilin drugs for *Brachyspira hyodysenteriae* isolated in Germany. *Vet. Microbiol.* 102: 25-32.
- Rohde, J.** 2007. Informationen zur Resistenzprüfung von Brachyspiren. [http://www.tiho-hannover.de/fileadmin/user\\_upload/tiho\\_hannover/kliniken\\_institute/18\\_mikrobiologie/Info-Dokumente/diagnostik\\_info\\_brachyspiren\\_resi.pdf](http://www.tiho-hannover.de/fileadmin/user_upload/tiho_hannover/kliniken_institute/18_mikrobiologie/Info-Dokumente/diagnostik_info_brachyspiren_resi.pdf)
- Rønne, H. und J. Szancer.** 1990. In vitro susceptibility of Danish field isolates of *Treponema hyodysenteriae* to chemotherapeutics in swine dysentery (SD) therapy. In: *Proceedings of the 11<sup>th</sup> Congr. Internat. Pig vet. Soc. Lausanne*: 126.

- Ross, J. I., E. A. Eady, J. H. Cove, W. J. Cunliffe, S. Baumberg und J. C. Wootton.** 1990. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport super-gene family. *Mol. Microbiol.* 4: 1207 – 1214.
- Schlez, K.** 2011. Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit bei *Brachyspira spp.*-Stämmen von deutschen Mastschweinen aus den Jahren 2003 – 2005. Diss. med. vet. Aus dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, JLU – Gießen.
- Schlünzen, F., E. Pyetan, P. Fucini, A. Yonath und J. M. Harms.** 2004. Inhibition of peptide bond formation by pleuromutilins: the structure of the 50S ribosomal subunit from *Deinococcus radiodurans* in complex with tiamulin. *Mol. Microbiol.* 54: 1287-1294.
- Schwarz, S. und C. Kehrenberg.** 2000. Antimikrobielle Resistenz: Resistenzmechanismen, Resistenzgene und Übertragungswege. *Amtstierärztl. Dienst Lebensmittelkontr.* 7: 55-60.
- Schwarz, S., A. Bottner, H. M. Hafez, C. Kehrenberg, M. Kietzmann, D. Klarmann, G. Klein, P. Krabisch, T. Kühn, G. Luhofer, A. Richter, W. Traeder, K. H. Waldmann, J. Wallmann und C. Werckenthin.** 2003. Empfindlichkeitsprüfung bakterieller Infektionserreger von Tieren gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen: Methoden zur *in-vitro* Empfindlichkeitsprüfung und deren Eignung in Hinblick auf die Erarbeitung therapeutisch nutzbarer Ergebnisse. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 116: 353- 361.
- Schwarz, S., A. Cloeckeaert und M. C. Roberts.** 2005. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. in: Aarestrup FM (ed.): *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, American Society for Microbiology. ASM Press. 73-98.
- Selbitz, H. J.** 2002. Bakterielle Krankheiten der Tiere, Gramnegative fakultativ anaerobe Stäbchenbakterien. in: M. Rolle, und A. Mayr (Hrsg.): *Medizinische Mikrobiologie, Infektionslehre und Seuchenlehre.* 7. Aufl, Enke Verlag, Stuttgart. 451-483.
- Spoo, J. W. und J. E. Riviere.** 1995. Chloramphenicol, Macrolides, Lincosamides, Fluoroquinolones and miscellaneous Antibiotics. in: *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (H. R. Adams, ed), Iowa State University Press, Ames (USA): 820-855.
- Stanton, T. B.** 1992. Proposal to change the genus designation *Serpula* to *Serpulina* gen. nov. containing the species *Serpulina hyodysenteriae* comb. nov. and *Serpulina innocens* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42: 189-190.
- Stanton, T. B., E. Fournié-Amazouz, D. Postic, D. J. Trott, P. A. Grimont, G. Baranton, D. J. Hampson und I. Saint Girons.** 1997. Recognition of two new species of intestinal spirochetes: *Serpulina intermedia* sp. nov. and *Serpulina murdochii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 1007-1012.
- Stanton, T. B., E. L. Rosey, M. J. Kennedy, N. S. Jensen und B. T. Bosworth.** 1999. Isolation, oxygen sensitivity, and virulence of NADH oxidase mutants of the anaerobic spirochete *Brachyspira (Serpulina) hyodysenteriae*, etiologic agent of swine dysentery. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 5028-5034.

- Stanton, T. B., S. B. Humphrey, D. O. Bayles und R. L. Zuerner.** 2009. Identification of a divided Genome for VSH-1, the Prophage-Like Gene Transfer Agent of *Brachyspira hyodysenteriae*. J. Bacteriol. 191(5): 1719-1721.
- Stege, H., T. K. Jensen, K. Møller, P. Baekbo und S.E. Jorsal.** 2000. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. Prev. Vet. Med. 46: 279-292.
- Suh, D. K. und J. C. Song.** 2005a. Simultaneous detection of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* spp. in swine intestinal specimens by multiplex polymerase chain reaction. J. Vet. Sci. 6: 231-237.
- Suh, D. K. und J. C. Song.** 2005b. Prevalence of *Lawsonia intracellularis*, *Brachyspira hyodysenteriae* and *Salmonella* in swine herds. J. Vet. Sci. 6: 289-293.
- Tait-Kamradt, A., T. Davies, M. Cronan, M. R. Jacobs, P. C. Appelbaum und J. Sutcliffe.** 2000. Mutations in 23S rRNA and ribosomal protein L4 account for resistance in pneumococcal strains selected in vitro by macrolide passage. Antimicrob. Agents Chemother. 44: 2118-2125.
- Taylor, D. J. und T. J. Alexander.** 1971. The production of dysentery in swine by feeding cultures containing a spirochaete. Br. Vet. J. 127: 58-61.
- Thomson, J. R, W. J. Smith, B. P. Murray, D. Murray, J. E. Dick und K. J. Sumption.** 2001. Porcine enteric spirochete infections in the UK: Surveillance data and preliminary investigation of atypical isolates. Anim. Health Res. Rev 2: 31–36.
- Treede, I., L. Jakobsen, F. Kirpekar, B. Vester, G. Weitnauer, A. Bechthold und S. Douthwaite.** 2003. The avilamycin resistance determinants AviRa and AviRb methylate 23S rRNA at the guanosine 2535 base and the uridine 2479 ribose. Mol. Microbiol. 49: 309–318.
- Ungemach, F. R., I. Emmerich, J. Preuß, P. Hajek und H. Otilie.** 2010. Vetidata - Veterinärmedizinische Informationsdienst für Arzneimittelanwendung, Toxikologie und Arzneimittelrecht. <http://www.vetidata.de/>.
- Vangroenwege F., E. De Graef, C. Miry und M. Vanrobaeys.** 2010. Recent antimicrobial sensitivity data *Brachyspira hyodysenteriae* in Belgium: An analysis of evolution. In: Proceedings of the 2<sup>nd</sup> European Symposium on Porcine health Management, Hannover, Germany.
- Verspohl, J., C. Feltrup, S. Thiede und G. Amtsberg.** 2001. Zur Diagnostik von Schweinedysenterie und Spirochaetendiarrhoe. 3. Mitteilung: Ergebnisse kulturell-biochemischer Differenzierung intestinaler Brachyspiren in der Routinediagnostik der Jahre 1997 bis 1999. Dtsch. Tierärztl. Wochenschr. 108: 67-69.
- Vester, B. und S. Douthwaite.** 2001. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob. Agents Chemother. 45: 1–12.
- Waldmann, K. H. und E. G. Lindemann.** 1991. Untersuchungen zum Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt bei dysenteriekranken Mastschweinen. Prakt. Tierarzt, Collegium Veterinarium XXII, 50-54.

- Waldmann, K. H., M. Wendt und G. Amtsberg.** 2000. Untersuchungen zur *Brachyspira*-Diagnostik und Behandlungsstrategien bei der Schweinedysenterie. Dtsch. tierärztl. Wschr. 107: 486-489.
- Waldmann, K. H. und H. Plonait.** 2004. Dysenterie (Swine Dysentery). In: Lehrbuch der Schweinekrankheiten. K.-H. Waldmann, M. Wendt (Hrsg.) 4. Auflage Parey Verlag, Berlin. S.350-355.
- Wanchanthuek P., M. I. Bellgard, T. La, K. Ryan, P. Moolhuijzen, B. Chapman, M. Black, D. Schibeci, A Hunter, R. Barrero, N. D. Phillips and D. J. Hampson.** 2010. The complete genome sequence of the pathogenic intestinal spirochete *Brachyspira pilosicoli* and comparison with other *Brachyspira* genomes. PLoS ONE 5(7): e11455
- Weisblum, B. und V. Demohn.** 1969. Erythromycin-inducible resistance in *Staphylococcus aureus*: survey of antibiotic classes involved. J. Bacteriol. 98: 447–452.
- Whipp, S. C., I. M. Robinson, D. L. Harris, R. D. Glock, P. J. Matthews und T. J. Alexander.** 1979. Pathogenic synergism between *Treponema hyodysenteriae* and other selected anaerobes in gnotobiotic pigs. Infect. Immun. 26: 1042-1047.
- Wilcock, B. P. und H. J. Olander.** 1979. Studies on the pathogenesis of swine dysentery. II. Search for a cytotoxin in spirochetal broth cultures and colon content. Vet. Pathol. 16: 567-573.
- Willems, H. und G. Reiner.** 2010. A multiplex real-time PCR for the simultaneous detection and quantitation of *Brachyspira hyodysenteriae*, *Brachyspira pilosicoli* and *Lawsonia intracellularis* in pig faeces. Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 123: 205-209.
- Wilson D. N.** 2011. On the specificity of antibiotics targeting the large ribosomal subunit. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1241: 1-16.
- Zaman, S., M. Fitzpatrick, L. Lindahl und J. Zengel.** 2007. Novel mutations in ribosomal proteins L4 and L22 that confer erythromycin resistance in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 66(4): 1039–1050.
- Zuerner, R. L. und T. B. Stanton.** 1994. Physical and genetic map of the *Serpulina hyodysenteriae* B78T chromosome. J. Bacteriol. 176: 1087–1092.

## 9 Anhang

### BHI-Medium

Fa. Merck KGaA, Darmstadt	37 g
A. dest.	ad 1.000 ml

### TSA<sup>CVSSR</sup>-Agar (mit Schafblut)

Caso-Agar, Fa. Merck KGaA, Darmstadt	40 g
defibriniertes Schafblut	50 ml
Colistin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	6,23 mg
Vancomycin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	6 mg
Spectinomycin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	200 mg
Spiramycin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	15,25 mg
Rifampicin (Fa. Sigma, Taufkirchen)	12,5 mg
A. dest.	ad 1000ml

### 1 x TE

Tris	10 mM
EDTA	1 mM

### 50 x TAE-Elektrophoresepuffer

Zusammensetzung:

Tris	2 M
Essigsäure	1 M
EDTA	50 mM

### Einwaage für 1000 ml:

242,28 g Tris
60,05 g Essigsäure
18,61 g EDTA
ad 1000 ml mit VE-Wasser



---

**10x Probenauftrags-Puffer**

Zusammensetzung:

0,3% Orange G

25% Saccharose

**Einwaage für 10 ml:**

0,03 g Orange G

2,5 g Saccharose

ad 10 ml mit aq. bidest.

## Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Gerald Reiner für das entgegengebrachte Vertrauen in der Klinik, die Überlassung des interessanten Themas und die wohlwollende Betreuung sowohl dieser Arbeit als auch des klinischen Alltags.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Georg Baljer für die Bereitstellung aller Mittel, die zum Anfertigen des mikrobiologischen Teils dieser Arbeit nötig waren. Herrn Dr. Werner Herbst und Jörg Heuser danke ich besonders für die Einarbeitung in die Brachyspirendiagnostik und die konstruktiven gemeinsamen Arbeitstage in humorvoller Atmosphäre.

Weiterhin danke ich dem Laborleiter der Klinik für Schweine, PD. Dr. Hermann Willems, sowie Bettina Hopf und Ute Stoll für die Geduld und Unterstützung beim molekularbiologischen Teil dieser Arbeit.

Vielen Dank auch an Frau Dr. Judith Rohde vom Institut für Mikrobiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover für die Bereitstellung eines großen Teils der verwendeten *Brachyspira hyodysenteriae*-Isolate.

Den praktischen Tierärzten, die mich auf Dysenterie-erkrankte Betriebe aufmerksam machten und mir die Möglichkeit verschafft haben, Proben zu entnehmen, danke ich ebenfalls.

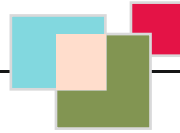
Meinen Kolleginnen aus der Klinik für Schweine Sabrina Becker, Cilia Kronenberg und Lara Jansing danke ich für die Entlastung in der Klinik, die motivierenden Worte und vor allem für das gute Verhältnis und den Zusammenhalt in der Klinik.

Für die vielen erholsamen Abende und die schöne Zeit zusammen danke ich meinen lieben Freundinnen Eva-Maria Trappe, Verena Vögely und Sabrina Mohrs.

Mein besonderer Dank gilt Stephan von Berg, für seine schier unermüdliche fachliche Einbringung und persönliche Inspiration.

Zu guter Letzt danke ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern Friedrich und Heidi Hillen für die stetige, liebevolle Unterstützung und meinen Schwestern Simone und Stefanie für ihre Fürsorge und ihr Verständnis

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5977-4



9 783835 959774